

**Der Einfluss von Cytokinin auf die Entwicklung des  
Sprossmeristems und auf den Ertrag von *Arabidopsis thaliana* und  
*Brassica napus***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Elisabeth Maria Otto

aus Basel

2013



Diese Arbeit wurde von März 2008 bis Februar 2013 am Institut für Biologie/Angewandte Genetik der FU Berlin angefertigt. Die Betreuung der Arbeit übernahm Prof. Dr. Thomas Schmülling.

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

2. Gutachter: Prof. Dr. Tomáš Werner

Disputation am 13.05.2013



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Das Pflanzenhormon Cytokinin</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 Cytokininbiosynthese .....	8
1.1.2 Modifizierte Cytokininformen.....	9
1.1.3 Cytokininabbau .....	10
1.1.4 Cytokinintransport.....	11
1.1.5 Cytokininsignaltransduktion.....	11
1.1.6 Cytokindefizienz und -überschuß.....	14
<b>1.2 Das apikale Sprossmeristem</b> .....	<b>16</b>
1.2.1 Die Anatomie des Sprossapex .....	17
1.2.2 Die genetische und hormonelle Regulation des Sprossmeristems .....	19
1.2.3 Die Etablierung des Sprossmeristems während der Embryogenese.....	23
<b>1.3 Kurze Einführung in die Entstehung und Bedeutung von Raps</b> .....	<b>24</b>
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>26</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>28</b>
2.1.1 Computerprogramme und Internetressourcen .....	28
2.1.2 Analysesets .....	29
2.1.3 Enzyme .....	30
2.1.4 Plasmide und Vektoren.....	31
2.1.5 Oligonukleotide .....	31
2.1.6 Bakterienstämme .....	32
2.1.7 Pflanzen .....	32
<b>2.2 Methoden mit lebenden Organismen</b> .....	<b>33</b>
2.2.1 Kultivierung von Bakterien .....	33
2.2.2 Herstellung elektrokompenter Zellen .....	34
2.2.3 Transformation von Bakterien.....	34
2.2.4 Kultivierung von Pflanzen.....	35
2.2.5 Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	35
2.2.6 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	36
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>36</b>
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	36
2.3.2 Agarosegelelektrophorese .....	36

2.3.3	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	36
2.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	37
2.3.5	Klonierung.....	37
2.3.5.1	Klonierung von <i>AHP6</i> .....	37
2.3.5.2	Klonierung der <i>Brassica CKX3, CKX5</i> und <i>CLV1</i> Sequenzen.....	37
2.3.5.3	Klonierung der <i>antiCKX3</i> und <i>antiCKX5</i> amiRNA-Sequenzen.....	38
2.3.5.4	Klonierung der meristemdomänenspezifischen Konstrukte.....	38
2.3.5.5	Klonierung des <i>pCLV3:GFP</i> Konstrukts.....	40
2.3.6	DNA-Restriktionsverdau.....	40
2.3.7	Sequenzierung.....	41
2.3.8	DNA-Extraktion aus Pflanzen.....	41
2.3.9	RNA-Extraktion aus Pflanzen.....	41
2.3.10	Semiquantitative RT-PCR.....	42
2.3.11	cDNA-Synthese.....	42
2.3.12	Quantitative Echtzeit-PCR.....	42
<b>2.4</b>	<b>Histologische Methoden.....</b>	<b>44</b>
2.4.1	Lichtmikroskopie.....	44
2.4.2	Toluidinblaufärbung.....	45
2.4.3	Gewebeentfärbung.....	45
2.4.4	Lasermikroskopie.....	45
2.4.5	Raster-Elektronenmikroskopie.....	46
2.4.6	In-situ-Hybridisierung.....	46
2.4.6.1	Erstellung der RNA-Sonde.....	46
2.4.6.2	Einbettung und Schneiden von Pflanzengewebe.....	47
2.4.6.3	Hybridisierung und Färbung.....	47
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Arabidopsis <i>ckx3 ckx5 ahp6</i> Dreifachmutante.....</b>	<b>49</b>
3.1.1	<i>AHP6</i> In-situ-Hybridisierung im Infloreszenzmeristem von Arabidopsis.....	49
3.1.2	Untersuchung der Infloreszenzmeristeme von <i>ckx3 ckx5 ahp6</i> Mutanten.....	50
3.1.3	Blütenmerkmale der <i>ckx3 ckx5 ahp6</i> Mutanten.....	52
3.1.4	Schotenansatz der <i>ckx3 ckx5 ahp6</i> Mutanten.....	54
3.1.5	Untersuchung vegetativer Merkmale von <i>ckx3 ckx5 ahp6</i> Mutanten.....	54
<b>3.2</b>	<b>Domänenspezifische Veränderung des Cytokininstatus im Sprossmeristem von <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>56</b>
3.2.1	Phänotypische Beschreibung der transgenen Linien.....	57
3.2.1.1	Die Entwicklung der <i>pCLV3:CKX1</i> transgenen Pflanzen.....	58
3.2.1.2	Die Entwicklung der <i>pCLV3:ARR1-SRDX</i> transgenen Pflanzen.....	60

3.2.1.3	Die Entwicklung der <i>pCLV3:ROCK2</i> transgenen Pflanzen .....	61
3.2.1.4	Die Entwicklung der <i>pWUS:CKX1</i> transgenen Pflanzen .....	63
3.2.1.5	Die Entwicklung der <i>pWUS:ARR1-SRDX</i> transgenen Pflanzen.....	64
3.2.1.6	Die Entwicklung der <i>pWUS:ROCK2</i> transgenen Pflanzen .....	65
3.2.1.7	Die Entwicklung der <i>pCLV1:CKX1</i> transgenen Pflanzen .....	67
3.2.1.8	Die Entwicklung der <i>pCVL1:ARR1-SRDX</i> transgenen Pflanzen.....	68
3.2.1.9	Die Entwicklung der <i>pCLV1:ROCK2</i> transgenen Pflanzen .....	69
3.2.2	Weiterführende Charakterisierung der <i>pCLV3:ROCK2</i> transgenen Pflanzen.....	71
3.2.2.1	Entwicklung der Sprossmeristeme von <i>pCLV3:ROCK2</i> transgenen Pflanzen.....	71
3.2.2.2	Expression von zwei verschiedenen <i>GFP</i> -Reporterlinien in <i>pCLV3:ROCK2</i> transgenen Pflanzen.....	74
3.2.2.3	Blütenmerkmale von <i>pCLV3:ROCK2</i> transgenen Pflanzen .....	75
3.2.2.4	Vegetative Merkmale der <i>pCLV3:ROCK3</i> transgenen Pflanzen.....	76
3.2.2.5	Das <i>pCLV3:ROCK2</i> Transgen im Hintergrund verschiedenener Meristemmutanten	77
<b>3.3</b>	<b>Abregulation von <i>CKX3</i> und <i>CKX5</i> im Sprossapex von <i>Brassica napus</i>.....</b>	<b>80</b>
3.3.1	Klonierung der <i>Brassica</i> <i>CKX</i> -Sequenzen.....	80
3.3.2	In-situ-Hybridisierung von <i>CKX3</i> und <i>CKX5</i> mRNA im Infloreszenzmeristem von <i>Brassica napus</i> .....	82
3.3.3	Die <i>Brassica rapa</i> <i>CKX</i> Gene.....	83
3.3.4	Die <i>CKX3</i> und <i>CKX5</i> Gene von <i>Brassica napus</i> .....	84
3.3.5	Die Expression von <i>CKX3</i> und <i>CKX5</i> in verschiedenen Rapsorten .....	87
3.3.6	Klonierung und Transformation der <i>antiCKX</i> amiRNA-Konstrukte.....	87
3.3.7	Ertragsparameter der Raps-Primärtransformanten .....	91
3.3.8	Untersuchung der <i>CKX3</i> - und <i>CKX5</i> -Transkriptmenge in Pflanzen der T <sub>2</sub> - und T <sub>3</sub> -Generation .....	92
3.3.9	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Raps-Infloreszenzmeristemen .....	93
3.3.10	Erfassung verschiedener Ertragsparameter und Sprossmerkmale .....	94
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchung der <i>ckx3 ckx5 ahp6</i> Mutante.....</b>	<b>97</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Veränderung des Cytokininstatus in der <i>CLV3</i>-Domäne .....</b>	<b>99</b>
4.2.1	Absenkung des Cytokininstatus in der <i>CLV3</i> -Domäne .....	100
4.2.2	Erhöhung des Cytokininstatus in der <i>CLV3</i> -Domäne.....	101
4.2.2.1	Der vegetative Phänotyp von <i>pCLV3:ROCK2</i> Pflanzen .....	102
4.2.2.2	Das veränderte Sprossmeristem von <i>pCLV3:ROCK2</i> Pflanzen .....	104
4.2.2.3	Der Blütenphänotyp von <i>pCLV3:ROCK2</i> Pflanzen .....	109
<b>4.3</b>	<b>Die Veränderung des Cytokininstatus in der <i>WUS</i>-Domäne.....</b>	<b>110</b>
4.3.1	Absenkung des Cytokininstatus in der <i>WUS</i> -Domäne .....	111
4.3.2	Erhöhung des Cytokininstatus in der <i>WUS</i> -Domäne.....	112

<b>4.4</b>	<b>Die Veränderung des Cytokininstatus in der <i>CLVI</i>-Domäne .....</b>	<b>116</b>
4.4.1	Absenkung des Cytokininstatus in der <i>CLVI</i> -Domäne .....	117
4.4.2	Erhöhung des Cytokininstatus in der <i>CLVI</i> -Domäne.....	119
<b>4.5</b>	<b>Abregulation von <i>CKX3</i> und <i>CKX5</i> im Sprossapex von <i>Brassica napus</i>.....</b>	<b>120</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>125</b>
<b>6.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>127</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>8.</b>	<b>Verzeichnis der erfolgten Publikationen .....</b>	<b>143</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>144</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
<i>AHK</i>	<i>ARABIDOPSIS HISTIDINKINASE</i>
<i>AHP</i>	<i>ARABIDOPSIS HISTIDIN-PHOSPHOTRANSFERPROTEIN</i>
amiRNA	artificial microRNA (künstliche microRNA)
AMP	Adenosinmonophosphat
<i>ANT</i>	<i>AINTEGUMENTA</i>
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>ARF</i>	<i>AUXIN RESPONSE FACTOR</i>
<i>ARR</i>	<i>ARABIDOPSIS RESPONSEREGULATOR</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Bna</i>	<i>Brassica napus</i>
<i>Bol</i>	<i>Brassica oleracea</i>
<i>Bra</i>	<i>Brassica rapa</i>
<i>bum</i>	<i>bumbershoot</i>
cDNA	in DNA umgeschriebene mRNA
CDS	Cytokinindefizienzsyndrom
<i>CKX</i>	<i>CYTOKININOXIDASE/-DEHYDROGENASE</i>
<i>CLV</i>	<i>CLAVATA</i>
Col-0	Columbia-0
<i>CUC</i>	<i>CUP SHAPED COTYLEDON</i>
DAS	Englisch: Days after sowing (Tage nach der Aussaat)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FM	Blütenmeristem
<i>GFP</i>	<i>GRÜNFLUORESZIERENDES PROTEIN</i>
<i>GUS</i>	<i>β-GLUKURONIDASE</i>
<i>gor</i>	<i>gorgon</i>
iP	Isopentenyladenin
iPRMP/iPRDP/ iP RTP	Isopentenyladeninribosemono/di/triphosphat
<i>IPT</i>	<i>ISOPENTENYLTRANSFERASE</i>
mRNA	Messenger RNA
miRNA	microRNA
L1/2/3	Klonale Meristemschicht 1 - 3
<i>LOG</i>	<i>LONELY GUY</i>
<i>MP</i>	<i>MONOPTEROS</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i>
OZ	Organisatorisches Zentrum
p	Promotor
PZ	Periphere Zone
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit PCR
RAM	Wurzelmeristem
REM	Rasterelektronenmikroskop
<i>ROCK</i>	<i>REPRESSOR OF CYTOKININ DEFICIENCY SYNDROM</i>
RQ	Relative Quantität
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
RZ	Rippenzone
SAM	Sprossmeristem
SRDX	Repressor mit EAR-Motiv (Hiratsu <i>et al.</i> 2003)
<i>STM</i>	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
T <sub>1/2/3/4</sub>	Transformantengeneration (T <sub>1</sub> = Primärtransformant)
TCS	Zweikomponentensystem
TKG	Tausendkorngewicht
tRNA	Transfer-RNA
tZ	<i>trans</i> -Zeatin
tZRMP/tZRDP/tZRTP	<i>trans</i> -Zeatin-Ribosemono/di/triphosphat
WT	Wildtyp
<i>WUS</i>	<i>WUSCHEL</i>
ZZ	Zentrale Zone

# 1. Einleitung

Eine grundlegende Eigenschaft von Lebewesen ist die Fähigkeit zu wachsen. Pflanzen wachsen während ihres ganzen Lebenszyklus und bilden fortwährend neue Organe. Ermöglicht wird dies durch die ständige Anwesenheit undifferenzierter Stammzellen, die in speziellen Geweben, den Meristemen, lokalisiert sind. Durch Teilung geben die Stammzellen immerfort junge Zellen an ihre Umgebung ab, die dann nach weiteren Teilungen in verschiedene Organe und Gewebetypen differenzieren. Werden Meristemgewebe beschädigt oder brauchen sie sich auf, kann die Pflanze dormante Ersatzmeristeme aktivieren und weiter wachsen. Die Bildung, Dynamik und Erhaltung von pflanzlichen Meristemen sind äußerst komplexe Vorgänge, die im Wesentlichen durch Pflanzenhormone reguliert werden. Die Hormongruppe der Cytokinine spielt dabei eine zentrale Rolle.

## 1.1 Das Pflanzenhormon Cytokinin

Cytokinine sind eine Gruppe von Phytohormonen, die in eine Vielzahl pflanzlicher Prozesse involviert sind. Entdeckt wurden sie aufgrund ihrer Fähigkeit, die Zellteilung in Embryo- und Kalluskulturen anzuregen (van Overbeek *et al.* 1941; Miller *et al.* 1955). Seither wurden Cytokinine mit einer Vielzahl von pflanzlichen Prozessen in Verbindung gebracht. So sind sie an der Embryogenese beteiligt (Müller und Sheen 2008), sie regulieren die Entwicklung und den Aufbau der Leitgewebeanatomie in den Wurzeln (Mähönen *et al.* 2006a; Bishopp *et al.* 2011a; Bishopp *et al.* 2011b) und kontrollieren die Größe und Aktivität des Wurzelmeristems (Werner *et al.* 2001; Werner *et al.* 2003; Dello Ioio *et al.* 2007; Dello Ioio *et al.* 2008a; Dello Ioio *et al.* 2008b). Im Spross regulieren sie unter anderem die Homöostase des Sprossmeristems (Yanai *et al.* 2005; Gordon *et al.* 2009; Chickarmane *et al.* 2012) und das Auswachsen von Seitensprossen nach der Entfernung des Hauptsprossmeristems (Tanaka *et al.* 2006). Des Weiteren verzögern sie die Seneszenz (Gan und Amasino 1995) und spielen eine Rolle bei der Pathogenabwehr (Choi *et al.* 2010), der Reaktion auf Stress (Rivero *et al.* 2007; Jeon *et al.* 2010; Nishiyama *et al.* 2011) und der Vermittlung des Nährstoffstatus (Takei *et al.* 2001b; Igarashi *et al.* 2009). Viele dieser Regulationsprozesse geschehen in enger Interaktion mit anderen Hormonen, vor allem mit Auxin (Vanstraelen und Benkova 2012).

Cytokinine sind Adeninderivate mit verschiedenen  $N^6$ -Seitenketten (Mok und Mok 2001). Am häufigsten sind Adeninverbindungen mit Isoprengruppen, es existieren aber auch Cytokinine mit aromatischen Seitenketten. Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Typen variiert je nach Pflanzenart. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* L. sind *trans*-Zeatin (tZ, Abbildung 1 unten rechts) und seine Derivate die am häufigsten vorkommenden Cytokinine, in geringeren Mengenanteilen sind jedoch auch Isopentenyladenin (iP, Abbildung 1 unten links) und Dihydrozeatin

vorhanden (Chin-Atkins *et al.* 1996; Werner *et al.* 2003; Riefler *et al.* 2006). Der Gesamtcytokininstatus einer Pflanze wird durch die Faktoren Biosynthese, Inaktivierung und Speicherung durch Konjugation, Abbau sowie den Transport bestimmt (Mok und Mok 2001).

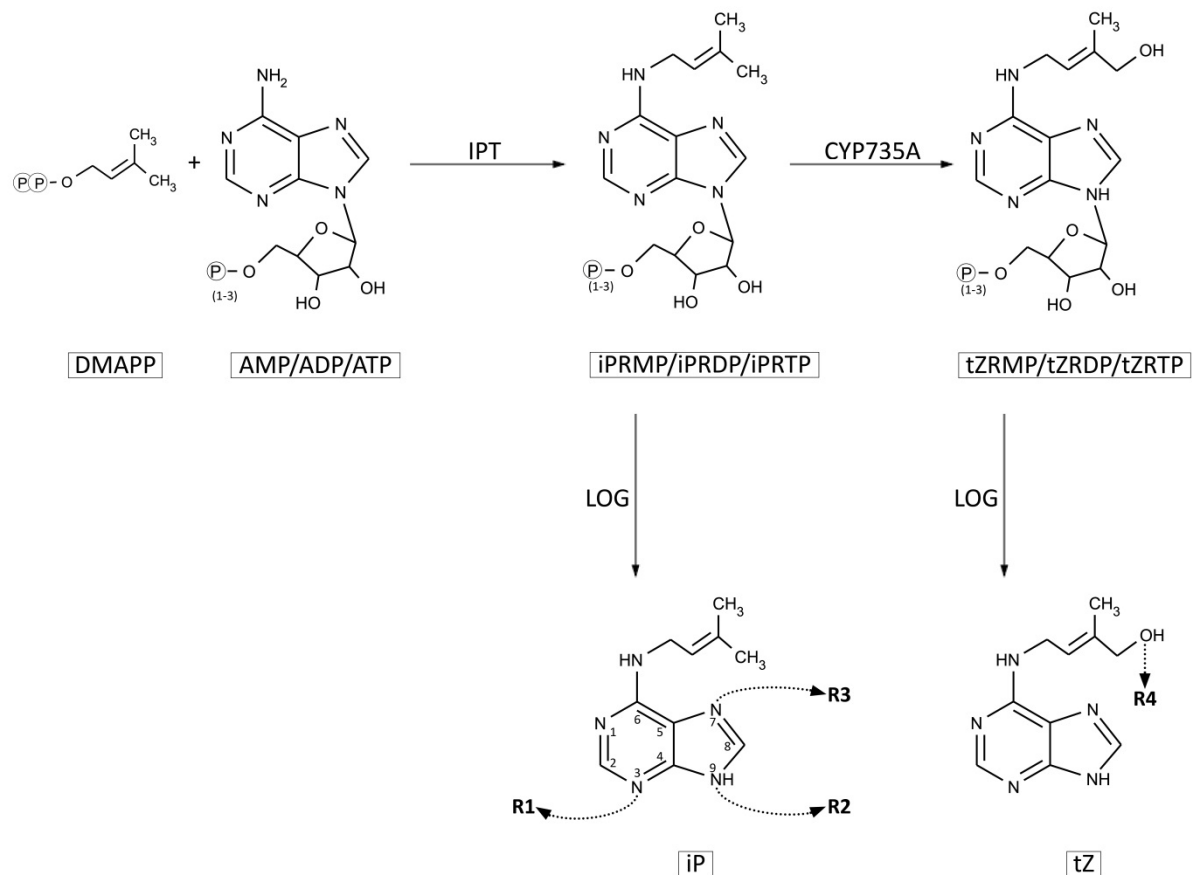
### 1.1.1 Cytokininbiosynthese

Bislang sind zwei Wege der Cytokininbiosynthese bekannt. Der zuerst postulierte (Vreman und Skoog 1972) basiert auf der Prenylierung von tRNAs, bei der eine Isoprenylgruppe auf ein Adenin in der Anticodonschleife übertragen wird, so dass ein in der tRNA gebundenes Cytokinin entsteht (Golovko *et al.* 2002). In Arabidopsis wird dieser Syntheseweg zur Herstellung von *cis*-Zeatin genutzt (Miyawaki *et al.* 2006). Die tRNA Umsatzraten sind jedoch nicht hoch genug, um mit dieser Reaktion die Menge der in der Pflanze vorkommenden Cytokinine zu erklären (Sakakibara 2006). Die meisten Cytokinine werden wahrscheinlich über einen zweiten Biosyntheseweg gebildet (Abbildung 1). Zu dessen Beginn wird die N<sup>6</sup>-Aminogruppe eines Adenosinphosphats (AMP, ADP oder ATP) prenyliert. Prenyldonor ist entweder Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, Blackwell und Horgan 1993) oder 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-Butenyl (HMBDP, Krall *et al.* 2002). Als Produkte entstehen, je nach Prenyldonor, iP- oder tZ-Nukleotide. Dieser Schritt wird von den Isopentenyltransferasen (IPTs) katalysiert. In Arabidopsis wurden neun *IPT* Gene identifiziert, wobei *IPT6* ein Pseudogen ist (Kakimoto 2001; Takei *et al.* 2001a). Sechs Mitglieder der Gruppe (*IPT1*, *IPT3* – *IPT5*, *IPT7*, *IPT8*) kodieren für ATP/ADP-IPTs und katalysieren die Prenylierung von freien Adenosinphosphaten. *IPT2* und *IPT9* sind dagegen tRNA-IPTs und katalysieren die oben beschriebene Prenylierung von tRNA. *IPT1*, *IPT3*, *IPT5* und *IPT8* sind in Chloroplasten aktiv, wohingegen *IPT4* im Cytosol und *IPT7* in den Mitochondrien zu finden sind (Kasahara *et al.* 2004). *IPTs* werden fast überall in der Pflanze exprimiert, vor allem aber in proliferierendem Gewebe, wie z.B. dem Sprossapex (Miyawaki *et al.* 2004).

iP-Nukleotide können an ihrer Prenylgruppe zu tZ-Nukleotiden hydroxyliert werden. Diese Reaktion wird in Arabidopsis von zwei Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert, CYP735A1 und CYP735A2 (Takei *et al.* 2004).

Um die biologisch aktiven freien iP- oder tZ-Cytokininbasen zu erhalten, muss die Ribosephosphateinheit vom Adenin abgespalten werden. In der Vergangenheit ging man davon aus, dass dies in zwei Schritten unter der Beteiligung einer Nucleotidase und einer Nucleosidase passieren müsse (Kamada-Nobusada und Sakakibara 2009). Die entsprechenden Gene wurden bislang jedoch noch nicht identifiziert. Statt dessen wurden die LONELY GUYs entdeckt, Phosphoribohydrolasen, für die im Genom von Arabidopsis neun Gene kodieren (*LOG1* – *LOG9*; Kuroha *et al.* 2009). Sie entfernen in einem einzigen Schritt die Phosphoribose, wobei den Enzymen nur Ribosemonophosphat-Cytokininverbindungen, nicht aber Ribosedi- oder -triphosphatverbindungen als Substrat dienen. Die Entdeckung der LOG Enzyme geht auf den *log1* Phänotyp in Reis zurück (Kurakawa *et al.* 2007). Das

Sprossmeristem der *log1* Mutanten ist nicht voll funktionsfähig und bringt Blüten hervor, die nur ein einziges Staubblatt, den *lonely guy* (deutsch: Einsamer Kerl), enthalten. Wie die IPTs sind LOGs in vielen Pflanzenteilen aktiv und die Expressionsdomänen der einzelnen *LOG* Gene sind z.T. überlappend (Kuroha *et al.* 2009).



**Abbildung 1** Vereinfachte Darstellung der Cytokininbiosynthese. IPTs übertragen eine Prenylseitengruppe auf ATP, ADP oder AMP. Prenyldonor ist DMAPP. Das entstandene iP-Ribosid kann durch CYP735A Enzyme in tZ-Ribosid umgewandelt werden. Sowohl iP-RMP als auch tZ-RMP werden von LOG Enzymen in aktive Cytokinine gespalten. Die Cytokininbasen können an den Stellen R1 – R4 durch Glykosylierung modifiziert werden.

Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis. Abbildung verändert nach Kamada-Nobusada und Sakakibara (2009).

### 1.1.2 Modifizierte Cytokininformen

In Pflanzen existieren viele modifizierte Cytokininformen (Sakakibara 2006). Die Modifikationen können reversibel oder irreversibel sein und erfolgen in der Regel durch die Übertragung eines Zuckerrests auf die Hydroxylgruppe von tZ (*O*-Glykosylierung bzw. *O*-Xylosylierung) oder auf den Adeninring (*N*-Glykosylierung). Ferner existieren auch Cytokinin nucleotide und –nucleoside.

Cytokinin nucleotide können wie erwähnt durch die LOG Enzyme zu Cytokininbasen abgebaut werden, sie sind jedoch auch schwach biologisch aktiv, d.h. sie können an einen Cytokininrezeptor binden und dort die Signaltransduktion (s. Abschnitt 1.1.5) auslösen (Spíchal *et al.* 2004). Auch für Cytokinin nucleoside wurde eine schwache biologische Aktivität nachgewiesen. Die Funktion der

übrigen modifizierten Cytokinine ist bisher kaum verstanden, zumal sie biologisch nahezu inaktiv sind (Spíchal *et al.* 2004; Romanov *et al.* 2006).

Cytokinin-*O*-Glykoside werden nicht durch Cytokinoxidasen abgebaut (Galuszka *et al.* 2007), können aber durch Abspaltung des Zuckerrests (Katalyse durch  $\beta$ -Glucosidasen) wieder in aktive Cytokininbasen umgewandelt werden (Brzobohaty *et al.* 1993; Falk und Rask 1995). Aufgrund dieser Eigenschaften ist denkbar, dass *O*-Glykoside als Cytokinin-Speichermoleküle genutzt werden könnten.

*N*-Glykoside können nicht wieder in freie Basen umgewandelt werden und stellen somit wahrscheinlich eine Möglichkeit der Cytokinin-Inaktivierung dar (Sakakibara 2006).

### 1.1.3 Cytokininabbau

Der Abbau von Cytokinin geschieht durch die irreversible Abspaltung der Prenylseitenkette vom Adeninring (Brownlee *et al.* 1975; McGaw und Horgan 1983). Die Katalyse erfolgt durch Cytokinoxidasen/-dehydrogenasen (CKX), einer kleinen Gruppe von Flavoproteinen. FAD wird als Co-Faktor benötigt und wird an eine spezielle FAD-Domäne des CKX-Proteins gebunden (Bilyeu *et al.* 2001).

In Arabidopsis gibt es sieben CKX Gene (*CKX1* – *CKX7*), die in verschiedenen Pflanzenteilen exprimiert werden, z.B. im Leitgewebe junger Pflanzen, in den Wurzelspitzen, während der Entwicklung der Spaltöffnungen, in Blüten und dem Sprossapex (Bilyeu *et al.* 2001; Werner *et al.* 2003; Köllmer 2009). Die Expressionsdomänen der CKX Gene überschneiden sich teilweise mit denen der *IPT* Gene, was bedeutet, dass Cytokinin z.T. direkt an seinem Syntheseort abgebaut werden kann (Werner *et al.* 2006). Dies ermöglicht in den entsprechenden Geweben eine sehr genaue und spezifische Regulation des Cytokiningehalts, zumal sich die CKX Enzyme sowohl in ihren biochemischen Eigenschaften als auch in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden (Werner *et al.* 2003; Galuszka *et al.* 2007). So sind CKX1 und CKX3 in der Vakuole lokalisiert, CKX7 dagegen im Zytoplasma. CKX2 und CKX4 werden sekretiert und sind im Apoplasten aktiv, was möglicherweise auch auf CKX5 und CKX6 zutrifft (Werner *et al.* 2003; Köllmer 2009). CKX2 und CKX4 sind die katalytisch aktivsten Enzyme der Familie und bauen sowohl freie Cytokinine als auch Cytokininriboside ab. Die anderen CKX Enzyme ist weniger aktiv, und bevorzugen z.T. Cytokininnukleotide oder –riboside (Galuszka *et al.* 2007).

Die Expression von CKX Genen wird durch Cytokinin angeregt, es existiert also eine negative Rückkopplung, die in den Zellen für einen ausgeglichenen Cytokiningehalt sorgt (Rashotte *et al.* 2003; Brenner *et al.* 2005; Kiba *et al.* 2005).

### 1.1.4 Cytokinintransport

In der Pflanze wird Cytokinin sowohl von der Wurzel in den Spross als auch in umgekehrter Richtung transportiert (Kudo *et al.* 2010). Cytokinin, das im Phloem basipetal transportiert wird, kontrolliert die Entwicklung und Organisation der Wurzelgewebe (Bishopp *et al.* 2011a; Bishopp *et al.* 2011b). Dies geschieht in enger Interaktion mit Auxin, das die Gewebeentwicklung antagonistisch zu Cytokinin mitgestaltet. Acropetal transportiertes Cytokinin aus dem Xylemsaft kann dem Spross den Stickstoffstatus in der Wurzel vermitteln (Samuelson *et al.* 1992; Takei *et al.* 2001b). Im Leitgewebe transportiertes Cytokinin ist außerdem relevant für die Bildung und Aktivität des Kambiums und somit für das sekundäre Dickenwachstum (Matsumoto-Kitano *et al.* 2008).

Während der Auxin-Transport auf molekularer Ebene bereits ausführlich erforscht wurde (Petrásek und Friml 2009), ist über Cytokinintransporter wenig bekannt. In einem Versuch mit Hefen wurde gezeigt, dass zwei Purinpermeasen (AtPUP1 und AtPUP2) tZ und iP transportieren können (Bürkle *et al.* 2003). Weiterführende Versuche in Pflanzen wurden jedoch nie durchgeführt. Wenig mehr weiß man über die Equilibrativen Nucleosidtransporter *AtENT3*, *AtENT6* und *AtENT7* aus *Arabidopsis* bzw. *OsENT2* aus Reis (Hirose *et al.* 2005; Sun *et al.* 2005; Hirose *et al.* 2008). Für diese Proteine konnte ebenfalls in Hefe eine Transportaktivität nachgewiesen werden (Hirose *et al.* 2005). Darüber hinaus wurde in einem Supressorscreen in *Arabidopsis* gezeigt, dass der Verlust der *AtENT8*-Aktivität den Phänotyp einer cytokininüberproduzierenden Mutante teilweise unterdrückt (Sun *et al.* 2005). Dieses Ergebnis wurde jedoch nie in weiterführenden Untersuchungen bestätigt.

### 1.1.5 Cytokinintransduktion

Über die molekularen Mechanismen der Cytokinintransduktion ist bereits einiges bekannt (Abbildung 2, Hwang *et al.* 2012). Die mehrstufige Vermittlung des Cytokininsignals beruht im Prinzip auf einer komplexen Variante des bakteriellen Zweikomponentensystems (englisch: TCS, two component system, Hwang und Sheen 2001). Beim TCS-Prototyp binden Signalmoleküle an membranständige Histidin-Proteinkinasen, was zu einer Autophosphorylierung des Histidinrests führt. Die Phosphorylgruppe wird von der Kinase auf ein Regulatorprotein übertragen. Das auf diese Weise aktivierte Regulatorprotein reguliert dann die Transkription der Antwortgene (Hwang *et al.* 2002). Die pflanzliche Cytokinintransduktion ist komplexer und beinhaltet mehr Phosphorylierungsschritte (Hwang und Sheen 2001). Cytokinin wird an der Zellaußenseite oder im ER von Histidinkinase (HKs) gebunden. HKs sind membranständige Rezeptoren, die als monomere Transmembranproteine in der Zell- und ER-Membran vorhanden sind (Wulfetange *et al.* 2011). Nach der Bindung von Cytokinin an die Sensordomäne der Rezeptoren finden sich diese zu Dimeren zusammen. Dies hat eine Autophosphorylierung der auf der anderen Membranseite liegenden Kinasedomänen zur Folge (Hwang und Sheen 2001). Die dadurch entstandene Phosphorylgruppe wird vom Histidinrest der

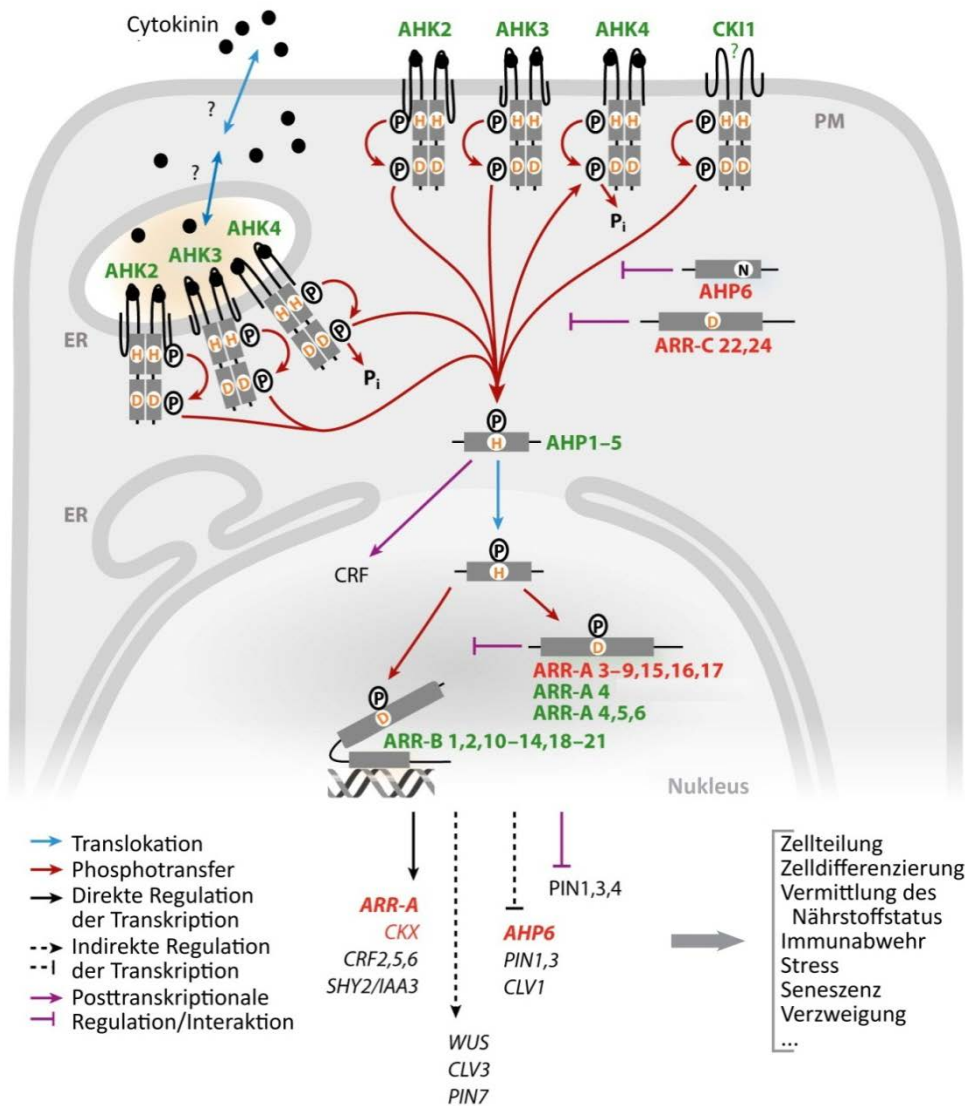
Kinasedomäne des Rezeptors auf den Aspartatrest einer anderen Domäne, der sogenannten Empfängerdomäne, übertragen. Von dort wird die Phosphorylgruppe an ein Histidin-Phosphotransferprotein (HP) weitergereicht. Das Transferprotein wandert in den Zellkern, wo es die Phosphorylgruppe auf die Empfängerdomäne eines B-Typ Regulatorproteins (englisch: *response regulator*, RR) überträgt. Das phosphorylierte Protein kann an die Promotoren von Zielgenen der Cytokininantwort binden und die Expression dieser Gene regulieren (Sakai *et al.* 2000; Hwang und Sheen 2001; Sakai *et al.* 2001). Ziel des Cytokinin-signalweges sind unter anderem die Gene der Regulatorproteine vom A-Typ, die schnell und stark durch Cytokinin heraufreguliert werden (D'Agostino *et al.* 2000). A-Typ RRs sind keine Transkriptionsfaktoren, da sie nicht an DNA binden können. Trotzdem sind sie in der Lage, mit ihrer Empfängerdomäne Phosphorylgruppen von HPs zu übernehmen (To *et al.* 2007) und konkurrieren dadurch mit den B-Typ RRs. A-Typ RRs sind daher negative Regulatoren der Cytokininantwort (Hwang und Sheen 2001). Ebenfalls negative Regulatoren mit Empfängerdomäne sind die RRs vom C-Typ, deren Transkription allerdings nicht durch Cytokinin aktiviert wird (Kiba *et al.* 2004).

Neben der Aktivierung der Zielgene durch B-Typ RRs gibt es noch mindestens einen zweiten Weg der cytokininkontrollierten Genregulation. Eine Gruppe von AP2/ERF-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, die CRFs (englisch: Cytokinin response factor; Cytokininantwortfaktor) können mit aktivierten HPs interagieren und von diesen die Phosphatgruppe übernehmen (Rashotte *et al.* 2003; Rashotte *et al.* 2006; Cutcliffe *et al.* 2011). Auf diese Weise aktiviert, beeinflussen die CRFs ihrerseits die Transkription von Cytokininantwortgenen. Unter ihren Zielgenen befinden sich sowohl solche, die auch von B-Typ RRs beeinflusst werden, als auch andere Gene.

In Arabidopsis kodieren stets mehrere Gene für die verschiedenen Signaltransduktionskomponenten (Hwang *et al.* 2012). So gibt es drei Rezeptoren, *AHK2*, *AHK3* und *AHK4/CRE1/WOL*, die sich in ihrer Lokalisation und Substratspezifität unterscheiden (Stolz *et al.* 2011). Besonders gut erforscht ist *AHK4*, das in der Wurzelentwicklung (Mähönen *et al.* 2000) und der Regulation des SAM (Gordon *et al.* 2009; Chickarmane *et al.* 2012) wichtige Funktionen übernimmt. Ein weiteres Histidinkinaseprotein, CKI1, ist in der Lage, die Cytokinin-signaltransduktion anzuschalten (Kakimoto 1996). Allerdings konnte bislang keine Bindung von Cytokinin durch CKI1 nachgewiesen werden.

Die HPs sind in Arabidopsis mit sechs Genen vertreten, *AHP1* – *AHP6*, wobei *AHP6* ein Pseudophosphotransferprotein ist (Suzuki *et al.* 2000; Mähönen *et al.* 2006a). In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass *AHP6* im Gegensatz zu den anderen fünf *AHPs* ein negativer Regulator des Cytokinin-signalweges ist (Mähönen *et al.* 2006a). Es ist im Leitgewebe junger Wurzeln aktiv, wo es die Anlage des Zellmusters wesentlich beeinflusst. Darüber hinaus gibt es Hinweise aus GFP- bzw. GUS-Markergenanalysen, dass das Gen auch im SAM eine Rolle spielen könnte (Mähönen *et al.* 2006a; Gordon *et al.* 2009).





**Abbildung 2** Schematische Darstellung der Cytokininsignaltransduktion in Arabidopsis.

Cytokinin bindet an die Bindedomäne der membrangebundenen Rezeptoren (AHK2 – AHK4), was eine Autophosphorylierung der auf der anderen Membranseite gelegenen Rezeptorkinasedomäne bewirkt. Der Phosphorylrest wird von der Kinase- auf die Empfängerdomäne des Rezeptors übertragen und von dort auf ein AHP-Protein. AHPs können auch Phosphorylreste der membrangebundenen CKI1-Rezeptorkinasen übernehmen, obwohl vermutet wird, dass diese Rezeptoren kein Cytokinin binden können. Das phosphorylierte AHP-Protein wandert in den Zellkern, wo es die Phosphorylgruppe entweder auf ein B-Typ ARR- oder ein CRF-Protein überträgt. Die dadurch aktivierten Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression verschiedener Cytokininantwortgene. Primäre Ziele der Cytokininsignaltransduktion sind die Gene der A-Typ ARRs, die die Signaltransduktion negativ regulieren, indem sie mit den B-Typ ARRs um die Phosphorylgruppe konkurrieren. Weitere negative Regulatoren sind AHP6 und die C-Typ ARRs. D, Aspartatrest; H, Histidinrest; P, Phosphatgruppe; ER, Endoplasmatisches Retikulum; PM, Plasmamembran. Weitere Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis. Grün bezeichnet positive, rot negative Regulation. Verändert nach Hwang *et al.* (2012).

Weiterhin gibt es im Arabidopsisgenom 11 B-Typ *RR* Gene, *ARR1*, *ARR2*, *ARR10* – *ARR14* und *ARR18* – *ARR21* (Hwang *et al.* 2002). Die A-Typ *RRs* sind mit 10 Genen vertreten, *ARR3* – *ARR9* und *ARR15* - *ARR17*. Es existieren außerdem zwei C-Typ *RRs*, *ARR22* und *ARR24* (Kiba *et al.* 2004). Die verschiedenen *ARRs* sind in zahlreichen Geweben der Pflanze aktiv und die Expressionsdomänen der

einzelnen Gene überlappen häufig. In ihrer Funktion sind sie oft redundant, weshalb das Ausschalten einzelner Gene keinen oder nur einen schwachen Phänotyp verursacht (Mason *et al.* 2004; To *et al.* 2004). Im SAM beispielsweise sind gleichzeitig *ARR5*, *ARR7* und *ARR15* aktiv, um die Cytokininsignaltransduktion zu regulieren (Leibfried *et al.* 2005; Buechel *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2010).

Von den *CRFs* gibt es 8 Genkopien (*CRF1* – *CRF8*, Rashotte *et al.* 2006; Rashotte und Goertzen 2010). Über deren Expressionmuster ist bislang wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass sie redundant agieren, da einzelne *crf* Mutationen die Pflanze morphologisch kaum beeinflussen, Mehrfachmutanten jedoch Defekte während der Embryogenese oder der Kotyledonenentwicklung zeigen (Rashotte *et al.* 2006).

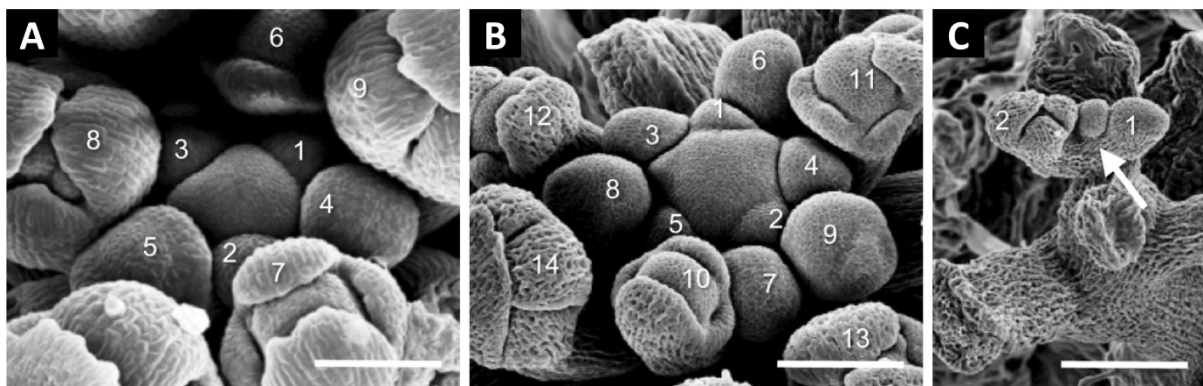
### **1.1.6 Cytokindefizienz und -überschuß**

Um die Funktion von Cytokinin in der Pflanze besser zu verstehen, wurden sowohl Cytokininüberproduzierende als auch cytokinindefiziente Pflanzen generiert und untersucht. Pflanzen mit erhöhtem Cytokiningehalt sind schon seit Ende der 1980er Jahre bekannt (Medford *et al.* 1989), zwölf Jahre später wurden die ersten Pflanzen mit Cytokininmangel publiziert (Werner *et al.* 2001). Die konstitutive Expression von *CKX* Genen unter dem *35S* Promotor führte zu cytokinindefizienten Arabidopsis- bzw. Tabakpflanzen (Werner *et al.* 2001; Werner *et al.* 2003). Diese zeichneten sich durch einen charakteristischen Phänotyp aus, der als Cytokinindefizienzsyndrom (CDS) bezeichnet wird: Das Wurzelsystem war durch einen höhere Dichte von Verzweigungen und schnelleres Wachstum stark vergrößert, im RAM fanden mehr Zellteilungen statt. Das Sprosswachstum war dagegen reduziert. Die Entwicklung war verlangsamt, die Blätter waren klein und enthielten weniger Zellen als Blätter von Wildtyppflanzen. In Arabidopsis brachten die Rosetten eine Vielzahl von Seitenrosetten und Seitensprossen hervor, was den Pflanzen ein buschiges Aussehen verlieh. Die Infloreszenzspore wuchsen nicht aufrecht, waren dünn und trugen nur wenige Blüten, die Schoten enthielten bis zu 90 % weniger Samen als die Schoten des Wildtyps. Das Sprossmeristem war stark verkleinert und stellte gelegentlich das Wachstum ein (Werner *et al.* 2001; Werner *et al.* 2003). Auch andere Arabidopsismutanten mit defekten Cytokiningenen zeigten Merkmale des CDS, z.B. verschiedene Rezeptorzwei- oder dreifachmutanten (Higuchi *et al.* 2004; Nishimura *et al.* 2004; Riefler *et al.* 2006), *ahp*-Quintupelmutanten (Hutchison *et al.* 2006; Deng *et al.* 2010), *arr1 arr10 arr12* Tripelmutanten (Argyros *et al.* 2008; Ishida *et al.* 2008) und verschiedene *ipt*-Drei- und Vierfachmutanten (Miyawaki *et al.* 2006). Heyl und Mitarbeiter generierten einen künstlichen Repressor der Cytokininsignaltransduktion, *ARR1-SRDX* (Heyl *et al.* 2008). Wurde dieser in Arabidopsis überexprimiert, waren die Pflanzen ebenfalls zwergwüchsig und das Wurzelsystem war vergrößert.

Aufgrund des Phänotyps der verschiedenen CDS-Pflanzen wurde deutlich, dass Cytokinin ein negativer Regulator des Wurzelwachstums ist, während es das Sprosswachstum und die SAM-Größe positiv reguliert. Die Untersuchung von Pflanzen mit einem erhöhten Cytokiningehalt bestätigte dies. Transgene Tabakpflanzen, die ein *IPT* Gen aus *Agrobacterium tumefaciens* überexprimierten, bildeten einen gestauchten Spross, waren verzweigter als die Kontrollpflanzen, entwickelten weniger Wurzeln, kleinere, dickere Blätter und seneszierten später (Smart *et al.* 1991; Smigocki 1991; Li *et al.* 1992; Hewelt *et al.* 1994). Je nachdem, wie stark das Transgen exprimiert wurde, war der Phänotyp stärker oder schwächer (Li *et al.* 1992). Pflanzen mit einem sehr hohen endogenen Cytokiningehalt verloren im Spross jegliche Apikaldominanz und bildeten gar keine Wurzeln. Diese Pflanzen waren auf Erde nicht überlebensfähig. Pflanzen mit schwächerem Phänotyp konnten zwar auf Erde wachsen, vertrockneten aber sehr leicht, was auf das verkleinerte Wurzelsystem zurückzuführen war (Li *et al.* 1992). In Arabidopsispflanzen rief die ektopische Expression eines *IPT* Gens einen ähnlichen Phänotyp hervor (Rupp *et al.* 1999). Bei den letztgenannten Pflanzen wurde auch das Sprossmeristem untersucht, dessen Größe oder Organisation durch den erhöhten Cytokiningehalt unverändert waren. Eine weitere Möglichkeit, Pflanzen mit einem erhöhten Cytokininstatus zu erzeugen, ist die Unterbindung des Cytokininabbaus. In ihrer Doktorarbeit generierte Bartrina (2006) verschiedene Arabidopsis *ckx*-Knockoutmutanten, wobei sie bis zu vier *ckx* k.o.-Allele miteinander kombinierte. Obwohl der Gehalt an iP und tZ in den Mutanten erhöht war (gemessen in der *ckx2 ckx4 ckx5 ckx6* Vierfachmutante), zeigten die meisten Pflanzen keinen oder nur einen schwachen Phänotyp. In einem Vergleich des Wurzelwachstums bildeten fast alle Mutanten kürzere Wurzeln als die Kontrollpflanzen (bis zu 20 % kürzer). Alle Mutanten mit einem *ckx3* Allel waren im Sprosswachstum leicht verändert, wobei die Doppelmutante *ckx3 ckx5* den stärksten Phänotyp zeigte. Diese Pflanzen entwickelten ein größeres Sprossmeristem (Abbildung 3), was in der Bildung von mehr Blüten bzw. Schoten und einem längeren Spross resultierte. Die Blütenorgane der *ckx3 ckx5* Mutanten waren vergrößert, besonders die Gynoecien, die fast doppelt so viele Samenanlagen enthielten wie Wildtyp-Gynoecien. Da die Gynoecien deutlich länger waren als die Antheren, war eine vollständige Bestäubung schwierig. Wurden jedoch alle Blüten ausreichend bestäubt, bildeten die Mutanten bis zu 55 % mehr Samen als die Kontrollpflanzen. Bartrina (2011) konnte anhand von In-situ-Hybridisierungen zeigen, dass sowohl *CKX3* als auch *CKX5* im SAM und in FM aktiv sind. Darüber hinaus wird *CKX5* in der Plazenta junger Gynoecien exprimiert. Durch die Deaktivierung beider *CKX* Gene steigt der Cytokiningehalt im Sprossapex und in den Blüten an (Bartrina, unveröffentlichte Daten), was eine Steigerung der verschiedenen meristematischen Aktivitäten und damit der Produktivität zur Folge hat. Es werden mehr Blüten gebildet und diese sind dazu befähigt, mehr Samen anzulegen. Der Samenertrag ist dementsprechend erhöht.

In Reis führt ein Defekt von *OsCKX2* ebenfalls zur Bildung von mehr Blüten und Samen und damit zu einer Steigerung des Ertrags (Ashikari *et al.* 2005). Die ertragssteigernde Wirkung von verschiedenen *ckx* Mutationen macht die *CKX* Gene zu interessanten Zielen der Ertragszüchtung.

Bei einer Suppressormutagenese mit cytokinindefizienten *p35S:CKX1* Pflanzen (Bartrina 2006) wurden zwei Mutanten identifiziert, die eine veränderte Cytokininrezeptoraktivität aufwiesen und dadurch in der Lage waren, das CDS zu unterdrücken (*repressors of cytokinin deficiency, rock*). In *rock2* Pflanzen war der AHK2-Rezeptor konstitutiv aktiv, während die *rock3* Mutation die konstitutive Aktivität des AHK3-Rezeptors bewirkte (Braun, unveröffentlichte Daten). Dies führte zu einer ständigen Aktivität des Cytokininübertragungsweges, und die Mutanten zeigten zum Teil Symptome von Pflanzen mit einem Cytokininüberschuss. So setzte bei diesen Pflanzen beispielsweise die Seneszenz später ein als bei den Kontrollpflanzen. *rock2* und *rock3* Pflanzen bildeten mehr Schoten als der Wildtyp, was auf eine erhöhte Aktivität des Sprossmeristems hinwies (Braun, unveröffentlichte Daten).



**Abbildung 3** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Arabidopsis-Infloreszenzmeristemen. (A) Wildtyp, (B) *ckx3 cks5* Mutante, (C) *35S:CKX1* Pflanze. Der Pfeil zeigt auf das Meristem. Die Blüthenprimordien sind ihrem Alter entsprechend aufsteigend nummeriert (Stadium 2 bis Stadium 6, nach Smyth *et al.* 1990). Maßstab = 100 µm. Verändert nach Bartrina *et al.* (2011).

## 1.2 Das apikale Sprossmeristem

Die embryonale Entwicklung von Tieren und Pflanzen ist grundlegend verschieden (Bäurle und Laux 2003). Beim fertig entwickelten tierischen Embryo ist der Bauplan des adulten Organismus bereits festgelegt und alle später benötigten Organe sind zumindest als Anlagen vorhanden. Dagegen entsteht während der pflanzlichen Embryogenese ein sehr vereinfachter Prototyp des erwachsenen Organismus, mit Wurzel, Hypokotyl und ein oder zwei Kotyledonen. Alle weiteren Organe wie z.B. Blätter, Blüten und Seitenwurzeln entstehen postembryonal, also nach der Keimung, aus sogenannten meristematischen Geweben (Clark 2001; Bäurle und Laux 2003).

Der Begriff „Meristem“ wurde von Carl Nägeli (1858) geprägt. Er bezeichnete damit ein Gewebe, das sich an den Scheitelpunkten der Pflanze befindet, also am Spross- und am Wurzelapex, und aus undifferenzierten, sich schnell teilenden Zellen besteht. Nägeli beobachtete, dass sich alle pflanzlichen Organe aus diesen beiden Polen rekrutierten, die Pole selbst sich aber nicht veränderten und über längere Zeit bestehen blieben. Tatsächlich beschrieb er damit das apikale Sprossmeristem (englisch: *shoot apical meristem*, SAM) und das apikale Wurzelmeristem (englisch: *root apical meristem*,

RAM), die bereits im Embryo angelegt werden und als Urmeristeme oder primäre Meristeme bezeichnet werden (Wagenitz 2003). Beide Meristeme zeichnen sich durch ein indeterminiertes Wachstum aus, d.h. sie geben durch Teilung ständig Zellen an ihre Umgebung ab, brauchen sich selbst aber nie auf und können z.B. bei manchen Bäumen über 2000 Jahre bestehen bleiben (Scheres 2007). Das RAM bildet die Zellen der Wurzel, während das SAM für das oberirdische Wachstum zuständig ist.

Nach der Keimung entstehen weitere Meristeme, die sogenannten Folgermeristeme oder sekundären Meristeme (Wagenitz 2003). Aus dem Perizykelgewebe der Wurzel bilden sich Seitenwurzeln, die an ihrer Spitze ebenfalls ein RAM ausbilden. Am Spross entstehen die Seitenmeristeme in den Blattachseln. Aus diesen Meristemen gehen die Seitensprosse hervor. Die Seitenwurzel- und Seitensprossmeristeme unterscheiden sich von den jeweiligen Hauptmeristemen nur durch ihre Entstehungsgeschichte; Organisation und Funktion sind gleich. Das SAM ist weiterhin für die Anlage der Blüten verantwortlich, die über ein eigenes Meristem verfügen (englisch: *floral meristem*, FM). Das FM legt die Blütenorgane an. Am Ende der Blütenentwicklung braucht es sich selbst auf, indem es seine Zellen in die zuletzt angelegten Fruchtblätter integriert. Neben den genannten apikalen Meristemen gibt es auch radiale Meristeme, die für das sekundäre Dickenwachstum der Pflanze verantwortlich sind (Nägeli 1858). Dazu gehören das Kambium, das das Leitgewebe bildet, und das Phellogen oder Korkkambium, das die Rinde bildet.

Da der Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit auf dem apikalen Sprossmeristem liegt, wird dieses in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

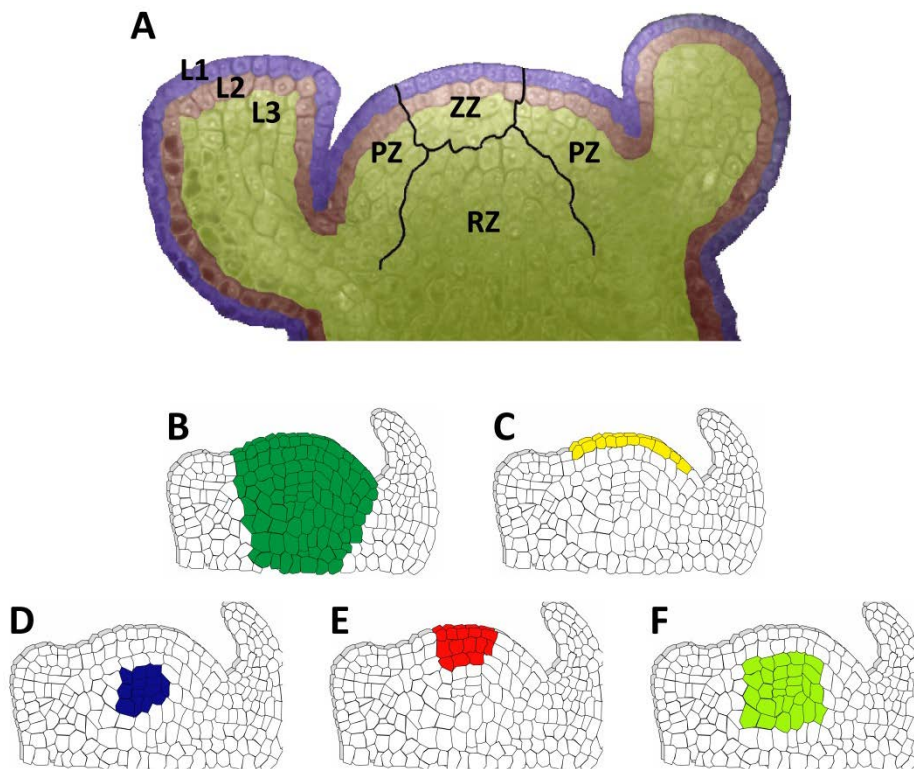
### **1.2.1 Die Anatomie des Sprossapex**

In diesem Abschnitt wird stellvertretend für die zweikeimblättrigen Pflanzen der Aufbau des apikalen Sprossmeristems von *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Auf die Meristeme von anderen Pflanzen wird nicht näher eingegangen.

Der Sprossapex von *Arabidopsis* wird in verschiedene, einander überlappende klonale Schichten und funktionale Zonen eingeteilt (Abbildung 4A; Ha *et al.* 2010). Es werden drei klonal voneinander getrennte Zellschichten unterschieden, bezeichnet als L1 - L3 (Irish und Sussex 1992). Die L1- und die L2-Schicht bestehen aus jeweils einer Zellreihe, in der sich die Zellen stets antiklin zur Meristemoberfläche teilen. Aus der L1 geht die Epidermis hervor, während aus den Zellen der L2 subepidermale Gewebe entstehen. Gemeinsam bilden die beiden Schichten die Tunika des Meristems. Die L3 befindet sich als Meristemkorporus darunter. L3-Zellen teilen sich in alle Richtungen, aus ihnen entstehen die verschiedenen Zelltypen des Leitgewebes sowohl der Blätter als auch des Sprosses und der Blüten.

Nach funktionellen Gesichtspunkten wird das SAM in drei Zonen eingeteilt. Die zentrale Zone (ZZ) befindet sich mittig, am höchsten Punkt des Meristems. Sie besteht aus vergleichsweise großen, sich

langsam teilenden Zellen. Zellen, die durch Teilung die ZZ verlassen, treten entweder in die ringförmig um das Meristemzentrum angelegte periphere Zone (PZ) oder in die unter der ZZ angeordnete Rippenzone (RZ) ein. Die Zellen dieser Zonen sind kleiner als die Zellen der ZZ und teilen sich häufig. Aus der PZ heraus werden einerseits die Anlagen für die Blätter und Blüten gebildet, die sogenannten Primordien, andererseits die Cortexgewebe der Nodien und Internodien. Die RZ ist der Ursprungsort für die Zellen des Leitgewebezyinders in der Sprossachse.



**Abbildung 4** Darstellung der klonalen Schichten und funktionalen Zonen des SAM von Arabidopsis, sowie der Expressionsdomänen verschiedener Gene.

(A) Längsschnitt durch das Infloreszenzmeristem. Die L1 ist blau, die L2 rot und die L3 grün hervorgehoben. Die funktionalen Zonen sind mit schwarzen Linien angedeutet: ZZ Zentrale Zone, PZ Periphere Zone, RZ Rippenzone. Verändert nach Carles und Fletcher (2003).

(B – F) Expressionsdomänen verschiedener Meristemgene im vegetativen SAM von Arabidopsis.

(B) *STM*, (C) *LOG4*, (D) *WUS*, (E) *CLV3*, (F) *CLV1*. Zellnetzzeichnung von Cell Signaling Lab Homepage, ENS Lyon ([www.ens-lyon.fr/rdp/sice/](http://www.ens-lyon.fr/rdp/sice/) 2012).

In der ZZ befinden sich die Stammzellen des Sprosses, auch Initialzellen genannt. Wagenitz (2003) bezeichnet mit diesem Begriff „Zellen in den Apikalmeristemen des Sprosses und der Wurzel, die durch inäquale Teilungen ständig Zellen abgeben, die sich weiter differenzieren, während sie selbst weiter teilungsfähig bleiben“. In den Sprossmeristemen der Samenpflanzen befindet sich eine ganze Gruppe dieser Zellen, die apikale Initialengruppe. Von ihr stammen, mit Ausnahme der Zellen des Hypokotyls und der Kotyledonen, alle Zellen der oberirdischen Pflanzenteile ab. Über die Größe dieser Zellgruppe gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Gestützt auf klonale Untersuchungen nimmt man an, dass das Arabidopsis-SAM neun langlebige Stammzellen enthält, drei

für jede Schicht (Furner und Pumfrey 1992; Irish und Sussex 1992; Schnittger *et al.* 1996). Andere Autoren (Xie *et al.* 2009; Yadav *et al.* 2009; Aggarwal *et al.* 2010), die sich auf genetische Markeranalysen und Echtzeitaufnahmen von fluoreszenzmarkierten Meristemen berufen (Fletcher *et al.* 1999; Brand *et al.* 2002; Reddy und Meyerowitz 2005), beziffern die Zahl der Stammzellen auf 35-40. In dieser Arbeit wird der Begriff Stammzelle im Sinne der letztgenannten Autoren verwendet.

### **1.2.2 Die genetische und hormonelle Regulation des Sprossmeristems**

Im Sprossmeristem verlassen ständig undifferenzierte Zellen die ZZ, beginnen, sich in der PZ bzw. RZ verstärkt zu teilen und werden schließlich in die Anlagen verschiedener Organe rekrutiert, wo sie zu spezifischen Zelltypen ausdifferenzieren. Es existieren komplexe genetische Regulationsmechanismen, die einerseits die teilungsaktiven Zellen des Meristemzentrums in einem undifferenzierten Zustand erhalten, andererseits aber die Zellen an den Meristemrändern in die verschiedenen Differenzierungsprozesse eintreten lassen. Neben einer Vielzahl von Genen sind an diesem regulatorischen Netzwerk auch Pflanzenhormone, v.a. Cytokinin und Auxin, beteiligt.

#### *STM und die Cytokininbiosynthese im SAM*

Eine Grundvoraussetzung für die Existenz des Sprossmeristems ist die Expression des Transkriptionsfaktorgens *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*, Long *et al.* 1996). Das *STM* Gen wird im gesamten SAM exprimiert, nicht aber in den Primordien (Abbildung 4B, nach Long *et al.* 1996). Wird *STM* unter einem konstitutiv aktiven *35S* Promotor überexprimiert, entstehen Pflanzen mit stark vergrößerten und desorganisierten Sprossmeristemen, die viele undifferenzierte Auswüchse bilden (Matsuoka *et al.* 1993; Williams 1998; Brand *et al.* 2002). Ist das Gen dagegen durch Mutation beschädigt, ist die Pflanze nicht in der Lage, ein SAM zu bilden und das Wachstum wird im Keimlingsstadium nach der Bildung von zwei Kotyledonen eingestellt. Bei Mutanten mit schwächeren *stm*-Allelen können zwar Meristeme gebildet aber nicht erhalten werden (Endrizzi *et al.* 1996; Long *et al.* 1996).

Eine Funktion des Transkriptionsfaktors ist es, durch die Aktivierung von *IPT7* die Cytokininbiosynthese im SAM anzuregen (Jasinski *et al.* 2005; Yanai *et al.* 2005). Wie wichtig Cytokinin für den Erhalt des Meristems ist, zeigten zwei Experimente mit starken *stm* Mutanten (Yanai *et al.* 2005). Wurde in diesen Pflanzen ein *pSTM:IPT7* Transgen exprimiert oder Cytokinin von außen aufgetragen, konnte ein SAM etabliert werden, das sich wie bei schwachen *stm* Mutanten nach der Bildung einiger Organe selbst aufbrauchte. Das Vorhandensein von Cytokinin ist also eine Voraussetzung dafür, dass ein SAM gebildet werden kann.

Neben *IPT7* sind mindestens zwei andere Cytokinin-Biosynthesegene, *LOG4* und *LOG7*, im SAM von Bedeutung. Yadav, Aggarwal und Kollegen zeigten mit In-situ-Hybridisierungen und Microarrays Transkription von *LOG7* in der ZZ (Yadav *et al.* 2009; Aggarwal *et al.* 2010), jedoch konnten

Chickarmane und Kollegen dies durch Promotor-GFP-Analysen nicht bestätigen (Chickarmane *et al.* 2012). Stattdessen zeigten sie *LOG7*-Aktivität in jungen Primordien. Allerdings entwickeln *log7* Mutanten als einzige *log*-Einfachmutanten ein im Vergleich zum Wildtyp um ca. 20% verkleinertes SAM, was für die Aktivität des Gens im SAM spricht (Tokunaga *et al.* 2012). Transkription von *LOG4* wurde in der L1 des SAM nachgewiesen (Abbildung 4C, nach Chickarmane *et al.* 2012). Eine Funktion von *LOG4* besteht möglicherweise darin, im SAM einen Gradienten von aktivem Cytokinin zu etablieren (s.unten).

#### *Der CLAVATA-WUSCHEL-Regelkreislauf*

Ein integraler Bestandteil der genetischen Meristemregulation ist der *CLAVATA-WUSCHEL*-Regelkreislauf. *WUSCHEL* (*WUS*) ist ein Transkriptionsfaktor, der direkt unterhalb der Stammzellen von Spross- und Blütenmeristemen exprimiert wird und die Teilungsfähigkeit der Stammzellen aufrecht erhält (Mayer *et al.* 1998; Fletcher *et al.* 1999; Schoof *et al.* 2000; Brand *et al.* 2001). Aufgrund der regulierenden Eigenschaften von *WUS* wird die Expressionsdomäne des Gens (Abbildung 4D) als organisatorisches Zentrum (*OZ*) bezeichnet (Mayer *et al.* 1998). In der Literatur gibt es keine einheitliche Meinung darüber, zu welcher funktionalen Meristemzone das *OZ* gehört. Manche Autoren schlagen es vollständig der *ZZ* zu (z.B. Aichinger *et al.* 2012), andere bezeichnen es als Teil der *RZ* (z.B. Perales und Reddy 2012).

Nach der Translation im *OZ* wandert das *WUS*-Protein in die Stammzellen, wo es an den Promotor des *CLAVATA3* Gens (*CLV3*) bindet (Yadav *et al.* 2011) und dessen Transkription aktiviert. *CLV3* ist ein Signalpeptid mit 13 Aminosäuren aus der *CLE*-Genfamilie (Fletcher *et al.* 1999; Sharma *et al.* 2003; Kondo *et al.* 2006; Ohyaama *et al.* 2009). Aufgrund seiner stammzellenspezifischen Expression wurde das *CLV3* Gen in genetischen Markeranalysen als Stammzellenmarker etabliert (Fletcher *et al.* 1999; Brand *et al.* 2001; Brand *et al.* 2002). Das *CLV3* Peptid wird von den Stammzellen sekretiert (Rojo *et al.* 2002). Im Apoplasten wandert es in tieferliegende Zellschichten, wo es von spezifischen membranlokalisierten *CLV3*-Rezeptorkinasen, unter anderem *CLV1* und *CLV2* (s. unten), gebunden wird (Lenhard und Laux 2003; Ogawa *et al.* 2008; Ohyaama *et al.* 2009). Dies führt zu einer Repression der *WUS*-Transkription. Durch die wechselseitige Transkriptionskontrolle von *WUS* und *CLV3* entsteht ein Regelkreislauf, der die gleichbleibende Größe des Stammzellenpools gewährleistet (Mayer *et al.* 1998; Fletcher *et al.* 1999; Brand *et al.* 2000; Schoof *et al.* 2000).

Das *WUS* Gen wurde entdeckt, weil Pflanzen, die homozygot für ein *wus* Allel sind, ihr Sprossmeristem nicht erhalten können und unvollständige Blüten bilden (Laux *et al.* 1996). Bei den *clavata* Mutanten (*clv1* - *clv3*) dagegen führt ein Verlust der Genaktivität zu stark vergrößerten Spross- und überaktiven Blütenmeristemen (Leyser und Furner 1992; Clark *et al.* 1993, 1995; Kayes und Clark 1998). Grund für diesen Phänotyp ist die Vergrößerung des Stammzellenpools im SAM und in den FM, da *CLV3* nicht mehr in der Lage ist, die stammzellenaktivierende Funktion von *WUS* negativ zu regulieren (Fletcher *et al.* 1999).



Bisher wurden vier CLV3-Rezeptoren identifiziert. CLV1 besitzt sowohl eine Sensor- als auch eine Kinasedomäne, die durch eine Transmembrandomäne verbunden sind (Clark *et al.* 1997) und agiert als Homomer. *CLV1* wird im SAM-Zentrum exprimiert (Abbildung 4F), genauer im basalen Bereich der ZZ sowie den angrenzenden Zellen der PZ und der RZ (Clark *et al.* 1997), d.h. auch im OZ. Im Gegensatz zu CLV1 verfügt CLV2 nur über eine Sensor- und eine Transmembrandomäne, die Kinasedomäne fehlt (Jeong *et al.* 1999). Um trotzdem als vollständiger Rezeptor funktionieren zu können, muss das Protein mit CORYNE (CRN), einer membrangebundenen Kinase ohne Sensordomäne, interagieren (Müller *et al.* 2008). Als vierter CLV3-Rezeptor wurde RPK2 (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2) identifiziert, eine Rezeptor mit Kinase- und Sensordomäne, der parallel zu den CLV1-Homomeren und den CLV2/CRN-Heteromeren agiert (Kinoshita *et al.* 2010). Gemeinsam vermitteln die vier Rezeptoren das CLV3-Signal aus den Stammzellen an die übrigen Zellen des Meristems. Über die Funktionsweise und die Komponenten dieser Signalübertragung ist bislang nichts bekannt.

Nachdem die grundlegende Funktion des CLV-WUS-Kreislaufs entschlüsselt worden war, wurden dem postulierten Regulationsmechanismus weitere Details zugefügt. So wurde deutlich, dass Cytokinin für die Erhaltung des OZ und die Aktivität von WUS von zentraler Bedeutung ist. *WUS* wird im SAM durch den Cytokininrezeptor AHK4 aktiviert, dessen Expressionsdomäne mit der von *WUS* überlappt (Gordon *et al.* 2009). Externe Applikation von Cytokinin auf das SAM führt zu einem Anstieg der *WUS*-Transkription, was z.T. mit der gleichzeitigen Abregulation des negativen *WUS*-Regulators *CLV1* zu erklären ist (Lindsay *et al.* 2006). Die Stammzellendomäne vergrößert sich durch die verstärkte *WUS*-Aktivität. Weiterhin inhibiert *WUS* die Transkription der A-Typ Responseregulatoren *ARR7* und *ARR15*, die abschwächend auf die Cytokininsignaltransduktion wirken (Leibfried *et al.* 2005). Ein Computermodell lieferte Hinweise, dass im OZ durch die Unterbindung einer negativen Rückkopplung durch A-Typ ARRs ein Bereich mit hohem Cytokininsignal entsteht, welches wiederum positiv auf die Transkription von *WUS* wirkt (Gordon *et al.* 2009). Die Cytokininsignaltransduktion und *WUS* könnten also in einer positiven Rückkopplungsschleife agieren, was das OZ zu einer scharf umrissenen Domäne mit hohem Cytokininoutput machen würde.

Ein jüngeres Computermodell zeigte, dass das Cytokinin, das durch LOG4 in der L1 des SAM gebildet wird, im Meristem möglicherweise einen Hormongradienten etabliert, der den Zellen des OZ Informationen über ihre Position relativ zur L1 liefern könnte (Chickarmane *et al.* 2012). Durch diese Kommunikation wäre es möglich, das OZ in immer gleichem Abstand von der L1 zu erhalten, unabhängig vom beständigen Wachstum und der Teilungsaktivität der beteiligten Zellen.

Chickarmane und Kollegen (2012) zeigten auch, dass das CLV-System den stimulierenden Effekt von Cytokinin im SAM abpuffert. Dies wurde deutlich, weil die Applikation von Cytokinin auf das SAM eine 1,5-fache Vergrößerung desselben hervorrief, während sich das Meristem der *clv3* Mutante bei gleicher Behandlung um das 15-fache vergrößerte.

Eine weitere Kontrollinstanz des Cytokininstatus und der *WUS*-Expression im SAM sind die CKX Enzyme. *CKX3* wird sehr stark im OZ exprimiert und *CKX5* schwach im gesamten Meristem bzw. stärker in tieferliegenden Bereichen der Rippenzone und dem Provaskulargewebe (Bartrina *et al.* 2011). Ein Verlust beider Gene führt zu vergrößerten Meristemen und einem Anstieg der *WUS*-Expression.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die räumlich sehr fein regulierte Konzentration und Signaltransduktion von Cytokinin zusammen mit dem CLV-*WUS*-Kreislauf die Zellidentitäten und -teilungsaktivitäten in dem hoch dynamischen System Sprossmeristem kontrolliert.

#### *Auxin und Giberellin im SAM*

Neben Cytokinin spielt auch das Phytohormon Auxin im Sprossapex eine wichtige Rolle. Dies wurde besonders durch die Untersuchung der *pin1* Mutante, die ein stark gestörtes Infloreszenzmeristem ausbildet, deutlich. Nach einer normalen vegetativen Entwicklung schieben *pin1* Pflanzen einen nackten, nadelförmigen Spross (Okada *et al.* 1991). Das SAM an der Spitze dieses Sprosses ist nicht in der Lage, Organe zu bilden. PIN1 ist ein membranassoziiertes Transportprotein (Gälweiler *et al.* 1998), das Auxin aus dem Meristemzentrum hinaus zu den Stellen der äußeren PZ transportiert, an denen sich die nächsten Primordien bilden werden (P<sub>0</sub>-Position bzw. Initium, Reinhardt *et al.* 2003; Heisler *et al.* 2005). Das Protein ist also für die Bildung lokaler Auxinmaxima verantwortlich. Reinhardt und Kollegen (2000) zeigten, dass das *pin1*-Sprossmeristem nach punktueller Applikation von Auxin auf die PZ ein Blütenprimordium bilden konnte, was bedeutet, dass ein punktueller Anstieg der Auxinkonzentration zur Primordieninitiation notwendig und ausreichend ist. Als direkte Folge der Auxinakkumulation an der P<sub>0</sub>-Stelle wird *STM* abreguliert und das Gen für den Transkriptionsfaktor AINTEGUMENTA (*ANT*) angeschaltet (Bainbridge *et al.* 2008). *ANT* ist in allen Primordien, die vom SAM oder den FM gebildet werden, aktiv, um die Zellteilung und damit das Größenwachstum des jeweiligen Organs zu kontrollieren (Elliott *et al.* 1996; Mizukami und Fischer 2000). Bislang ist nicht bekannt, durch welche Mechanismen die Veränderung der Auxinkonzentration mit der Abregulation von *STM* und der Transkription von *ANT* zusammenhängt.

Die *monopteros* Mutante (*mp*) bildet ebenfalls einen *pin1*-ähnlichen Phänotyp aus, allerdings bleibt die Behandlung des Sprossmeristems mit Auxin wirkungslos (Reinhardt *et al.* 2000). Das *MP* Gen kodiert für den AUXIN RESPONSE FAKTOR 5 (*ARF5*) und ist als einziges Mitglied der ARF-Familie in der äußeren PZ des SAM aktiv (Hardtke und Berleth 1998; Vernoux *et al.* 2010). ARF-Transkriptionsregulatoren sind Teil der Auxinsignaltransduktion. Ist *ARF5* defekt, kann in der PZ Auxin nicht mehr wahrgenommen werden, was erklärt, warum die externe Auxinapplikation bei *mp* Mutanten keine Primordienbildung hervorruft. Die Wirkung von Auxin ist also abhängig von der Fähigkeit bestimmter Meristembereiche, das Hormon wahrzunehmen.

Ein weiterer hormoneller Faktor bei der Bildung von Primordien ist Giberellin. *STM* reprimiert im Meristemzentrum das Gibberellinsynthesegen *GA20ox1* (Hay *et al.* 2002) und aktiviert die

Gibberellinkatabolismogene *GAox2* und *GAox4* an den Meristemrändern (Jasinski *et al.* 2005). Sobald jedoch in den jungen Primordien die *STM*-Aktivität erlischt, steigt die Transkription von Gibberellinsynthesegenen in diesen Geweben (Kaneko *et al.* 2003), so dass das Hormon das Wachstum der Blätter und Blüten kontrollieren kann.

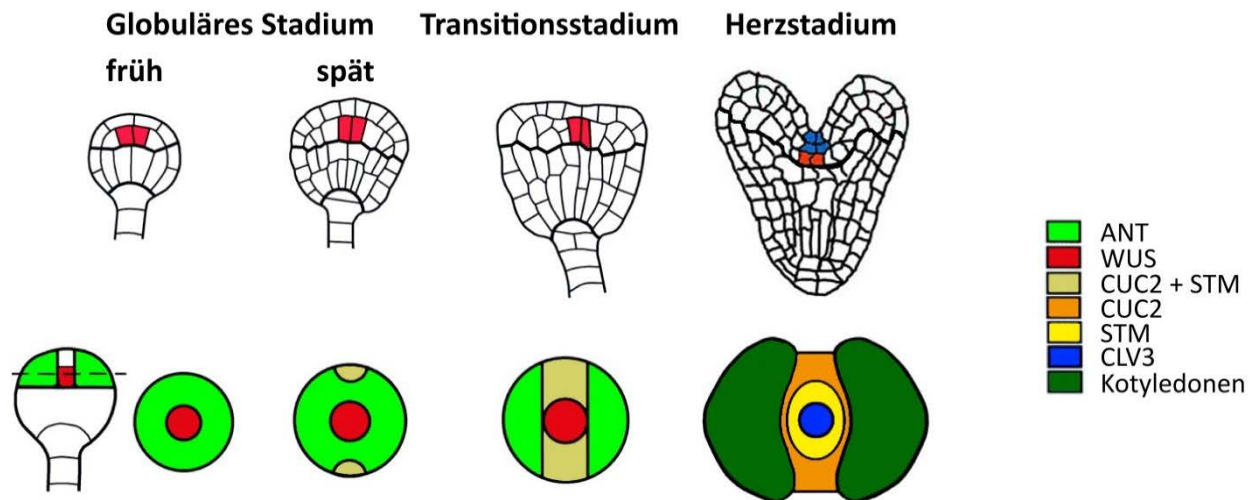
### **1.2.3 Die Etablierung des Sprossmeristems während der Embryogenese**

Nach der Befruchtung der pflanzlichen Eizelle entsteht in der Samenanlage des Gynoeciums der Embryo. Dieser durchläuft während seiner Entwicklung ein festgelegtes Programm von Zellteilungen, das hier kurz am Beispiel von *Arabidopsis* erläutert wird. Die Zygote teilt sich zunächst in eine apikale und eine basale Zelle. Aus letzterer entsteht der Suspensor, der die Verbindung zwischen Embryo und Mutterpflanze herstellt. Die obere Zelle wächst zum eigentlichen Embryo heran. Seine Entwicklung wird, basierend auf der jeweiligen Form, in verschiedene Stadien eingeteilt: globuläres Stadium, Herz-, Torpedo- und Spazierstockstadium. Der Embryo ist also zunächst kugelförmig und etabliert dann im Herzstadium durch die Anlage der Kotyledonen eine bilaterale Symmetrie. Anschließend streckt sich der Embryo in die Länge, so dass er in seinem Aussehen an einen Torpedo erinnert. Gegen Ende der Entwicklung biegt sich der Embryo in der Mitte durch, so dass die Wurzelspitze und die Spitzen der Kotyledonen nebeneinander liegen.

Sowohl das RAM als auch das SAM werden während der Embryogenese gebildet. Die hier beschriebene und in Abbildung 5 illustrierte Entwicklung des Sprossmeristems beruht im Wesentlichen auf den beiden Übersichtsartikeln von Boscá *et al.* (2011) und Lau *et al.* (2012).

Die Etablierung des SAM beginnt im globulären Stadium. Zu diesem Zeitpunkt ist der Embryo bereits klonal in eine obere und eine untere Zellgruppe geteilt. Aus dem unteren Teil werden Hypokotyl und Wurzel hervorgehen, während die obere Hälfte Entstehungsort von SAM und Kotyledonen ist. In der oberen Hälfte des kugelförmigen Embryos bildet sich in einem Ring die Expressionsdomäne des Transkriptionsfaktorgens *ANT* aus (Long und Barton 1998). Im Zentrum des *ANT*-Rings ist das *WUS* Gen aktiv (Mayer *et al.* 1998). Gleichzeitig entsteht von außen nach innen ein mit der *ANT*-Domäne teilweise überlappender Streifen von Zellen, die die Transkriptionsfaktoren *CUC1* und *CUC2* exprimieren (Aida *et al.* 1999; Takada *et al.* 2001). *CUC1* und *CUC2* aktivieren am Ende der globulären Phase die Transkription von *STM* (Takada *et al.* 2001), die Aktivität von *ANT* in diesem Bereich erlischt. Der Zellstreifen, in dem *STM* und die *CUC* Gene aktiv sind, definiert einen Bereich niedriger Zellteilung, wohingegen die Zellteilungsaktivität in den *ANT*-Domänen links und rechts davon steigt. Durch diese Ungleichheit bilden sich während des Transitionsstadiums in den *ANT*-Domänen die Primordien der Kotyledonen aus. Wenn im Herzstadium die Kotyledonen beginnen zu wachsen, wird zwischen den Kotyledonen durch einen noch unbekanntes Mechanismus die Expression der *CLV* Gene initiiert (Long *et al.* 1996; Fletcher *et al.* 1999), was darauf hindeutet, dass ab diesem Zeitpunkt der *CLV*-*WUS*-Kreislauf funktionsfähig ist (Schoof *et al.* 2000). Dafür spricht

auch, dass in dieser Entwicklungsphase zum ersten Mal das Signal von *TCS:GFP*, dem synthetischen Reporter der Cytokininsignaltransduktion, in der Expressionsdomäne von *WUS* sichtbar wird (Müller und Sheen 2008). Die *CUC*-Expressionsdomäne zieht sich im Herzstadium auf einen schmalen Ring um *CLV3/STM* herum zurück. Die charakteristische Struktur des SAM ist schließlich im Spazierstockstadium sichtbar (Barton und Poethig 1993; Long und Barton 1998). Ab dieser Phase gilt das Sprossmeristem als vollständig etabliert.



**Abbildung 5** Entwicklung des apikalen Pols während der Embryogenese von *Arabidopsis thaliana*. Obere Reihe: Längsansichten von Embryos und die Expression von *WUS* und *CLV3* während verschiedener Entwicklungsstadien. Die dicken schwarzen Linien repräsentieren die klonale Grenze zwischen apikalem und zentralem Embryo.

Untere Reihe: Aufsicht auf den Embryo während verschiedener Entwicklungsstadien. Die Expressionsdomänen verschiedener Gene, die an der Etablierung des SAM beteiligt sind, wurden farbig hervorgehoben. Abgeändert nach Laux *et al.* (2004) und Boscá *et al.* (2011).

### 1.3 Kurze Einführung in die Entstehung und Bedeutung von Raps

Ein Teilprojekt dieser Doktorarbeit wurde an Raps (*Brassica napus* L.) durchgeführt. Raps ist im Gegensatz zu *Arabidopsis* keine Modellpflanze und daher in der pflanzenmolekularbiologischen Forschung weniger präsent. Deshalb soll an dieser Stelle eine kurze Einleitung in die Gattung *Brassica* L. im Allgemeinen und *B. napus* im Besonderen folgen.

Die Gattung *Brassica* gehört wie *Arabidopsis* zu den Brassicaceae und umfasst eine ganze Reihe von Kulturpflanzen, wie z.B. die vielen verschiedenen europäischen und asiatischen Gemüsekohlarten (*B. oleracea* L. und *B. rapa* L.), braunen und schwarzen Senf (*B. juncea* (L.) CZERN. und *B. nigra* (L.) W.D.J.KOCH), sowie einige Rübchen (*B. rapa* ssp. *rapa*) und Steckrüben (*B. napus* ssp. *rapifera*). Des Weiteren gehört auch der Raps (*B. napus*) dazu, der wegen seiner ölhaltigen Samen schon seit ca. 4000 Jahren angebaut wird und in früherer Zeit vor allem zur Herstellung von Lampenöl genutzt wurde (Gupta und Pratap 2007). Im 17. und 18. Jahrhundert spielte Rapsöl als Schmierfett und

Brennstoff eine wichtige Rolle, verlor aber durch das Aufkommen fossiler Brenn- und Schmierstoffe seine Bedeutung. Wegen des bitteren Geschmacks wurde Raps kaum zur Speiseölproduktion genutzt und galt lange als Lieferant von minderwertigem „Armeleuteöl“. Einen neuerlichen Aufschwung erfuhr der Anbau erst, als es in den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts gelang Sorten zu züchten, die weder die für den Menschen unverträgliche Erucasäure, noch bittere Glucosinolate enthielten (00-Raps, z.B. Gupta und Pratap 2007). Seither ist Raps eine wichtige Pflanze zur Herstellung von Speiseöl und Tierfutter geworden; von geringerer Bedeutung ist die Nutzung von Rapsöl als Biodiesel. Der Züchtungsfokus, zumindest in den westlichen Ländern, liegt auf Qualitäts- und Ertragssteigerung, sowie Verbesserung von Krankheitsresistenz, Winterfestigkeit, Platzfestigkeit der Schoten und Frühreife (Röbbelen 1994; Rai *et al.* 2007).

Mit einer globalen Anbaufläche von ca. 32 Mio. ha und einer Produktion von 59 Mio. t im Jahr 2010 ist Raps weltweit die drittwichtigste Ölf Frucht nach Soja und Samenbaumwolle (FAO Website 2012). Im Vergleich der rapsproduzierenden Länder steht China (13,1 Mio. t, 7,4 Mio. ha) an erster Stelle, gefolgt von Kanada (11,9 Mio. t, 6,5 Mio. ha) und Indien (6,4 Mio. t, 5,5 Mio. ha). Deutschland belegt mit 5,7 Mio. t auf 1,5 Mio. ha Platz vier. 1961 gab es in Deutschland dagegen nur 0,2 Mio. ha Anbaufläche mit einer Ernte von 0,2 Mio. t, was bedeutet, dass die deutsche Rapsproduktion in den letzten 50 Jahren um fast das 30-fache gestiegen ist. Im Jahr 2002 lag in Deutschland die Produktion von Raps erstmals über der von Roggen und erreichte damit Platz fünf in der Liste der wichtigsten deutschen Ackerfrüchte. In größerem Stil werden in unserem Land nur Weizen, Zuckerrüben, Gerste und Kartoffeln angebaut (FAO Website 2012).

Während ihrer Entstehung erfuhr die Gattung *Brassica* eine Verdreifachung ihres ursprünglichen Chromosomensatzes (Schmidt *et al.* 2001; Lysak *et al.* 2005). Dieses Ereignis hatte eine gewisse Instabilität des polyploiden Genoms zur Folge, was innerhalb kurzer Zeit zu mehrfachem Verlust von Sequenzabschnitten sowie einer Neuordnung der Chromosomen führte (Lagercrantz 1998; Town *et al.* 2006). Die rezenten diploiden Brassicaarten stammen daher von ursprünglich hexaploiden Vorfahren ab, was sich vor allem darin äußert, dass viele Abschnitte des Genoms in dreifacher Kopie vorliegen. Neben Diploiden beherbergt die Gattung auch einige polyploide Arten (U 1935). Raps beispielsweise ist durch die Kreuzung von Rübsen (*Brassica rapa*, AA-Genom) mit Kohl (*Brassica oleracea*, CC-Genom) entstanden. Nach der Hybridisierung fand eine Verdoppelung (Allopolyploidisierung) des Chromosomensatzes statt, so dass das Genom von Raps allotetraploid ist (AACC-Genom) und daher jeweils zwei Kopien der elterlichen Chromosomensätze enthält ( $n = 19$ , davon 10 A und 9 C Chromosomen, U 1935). Das Genom von Raps ist mit 1132 Mbp ca. neunmal größer als das von *Arabidopsis* (Johnston *et al.* 2005).

Der komplexe Aufbau des Brassicagenoms macht die Gruppe zu einem schwierigen, aber gerade dadurch auch sehr interessanten Forschungsobjekt. Da viele Brassicaarten wie erwähnt bedeutende Nutzpflanzen sind, ist die Gattung Gegenstand intensiver genetischer und züchterischer Arbeiten. Im Jahr 2011 wurde das Genom von *B. rapa* publiziert (The *Brassica rapa* Genome Sequencing Project

Consortium 2011). Durch die Ergebnisse wurde die Genomverdreifung, die während der Entstehung der Gattung *Brassica* stattgefunden hatte, bestätigt. Auch die Umstrukturierung des Genoms als Folge der Polyploidisierung konnte nachvollzogen werden. Es wurden 41.174 proteinkodierende Gene identifiziert (Arabidopsis hat ca. 30.000 Gene), was bedeutet, dass nach der Entstehung des hexaploiden Vorfahren mehr als die Hälfte aller Gene verloren ging. Die Erkenntnisse, die über die strukturellen und funktionalen Folgen der Genomverdreifung gewonnenen wurden, sind nicht nur für die Brassicaforschung relevant, sondern auch für die Erforschung der Genomevolution anderer Nutzpflanzen mit verdreifachtem Genom, wie z.B. Weizen.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das apikale Sprossmeristem wird durch ein komplexes Netzwerk aus genetischen Faktoren und Pflanzenhormonen reguliert. Cytokinin spielt bei diesen regulativen Prozessen eine wichtige Rolle, die bisher allerdings nur teilweise verstanden ist. Es war Ziel dieser Dissertationsarbeit, die Relevanz des Hormons in verschiedenen Bereichen des SAM zu untersuchen, wobei der Schwerpunkt der Untersuchungen auf dem Meristemzentrum lag.

In *ckx3 ckx5* Doppelmutanten ist der Cytokiningehalt im SAM, v.a. im SAM-Zentrum, erhöht, was zu einer Vergrößerung des ganzen Meristems und einer Steigerung der Primordienbildungsrate führt (Bartrina *et al.* 2011). Es war bislang nicht bekannt, ob die Erhöhung des Cytokininstatus im SAM durch die Verstärkung des Cytokininsignalübertragungswegs eine ähnliche Wirkung hat. GUS-Bilder legten nahe, dass *AHP6*, ein negativer Regulator der Cytokininsignaltransduktion, im SAM aktiv sein könnte (Mähönen *et al.* 2006a). Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von *AHP6* im SAM zu bestätigen sowie *ahp6* Einzel- und verschiedene *ahp6 ckx3/5* Mehrfachmutanten phänotypisch zu untersuchen.

Das Sprossmeristem ist in mehrere eng begrenzte Domänen aufgeteilt, die sich durch ihre Funktion und ihr Genexpressionsprofil voneinander unterscheiden (Barton 2010). Obwohl Cytokinin im gesamten SAM vorhanden ist, ist über die Funktion des Hormons in den einzelnen Domänen, mit Ausnahme seiner Wirkung auf *WUS* im Organisatorischen Zentrum (Gordon *et al.* 2009; Chickarmane *et al.* 2012), wenig bekannt. Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob das Hormon auch in anderen Bereichen des SAM relevant ist und wo es welche Wirkung entfaltet, wobei das Hauptaugenmerk auf dem Meristemzentrum lag. Dafür wurden neun verschiedene meristemdomänenspezifische Promotor-Gen-Konstrukte hergestellt und in Arabidopsis transformiert. Jedes Transgen sollte entweder Cytokininüberschuss oder -mangel in einer bestimmten Meristemdomäne erzeugen bzw. suggerieren. Die transgenen Pflanzen wurden phänotypisch untersucht. Unter anderem wurden Aufnahmen von Meristemen am Rasterelektronenmikroskop

gemacht, anatomische Schnitte durch den Sprossapex angefertigt und Kreuzungen mit verschiedenen Meristemmutanten durchgeführt.

Die Untersuchung der Arabidopsis *ckx3 ckx5* Doppelmutante hatte gezeigt, dass mit dem Anstieg des Cytokiningehalts in Sprossapex und Blüten eine Steigerung des Samenertrags einherging (Bartrina *et al.* 2011). Basierend auf dieser Beobachtung wurde im dritten Teil dieser Arbeit erforscht, ob auch in der Nutzpflanze Raps durch die Abregulation der entsprechenden *CKX3* und *CKX5* Gene ein positiver Effekt auf den Samenertrag erzielt werden kann. Aufgrund der polyploiden Natur des Rapsgenoms wurde eine amiRNA-Strategie gewählt, um die Transkriptmenge möglichst aller *CKX3*- und *CKX5*-Genkopien zu reduzieren. Dafür wurden vier verschiedene amiRNA-Konstrukte kloniert und in Raps transformiert. Die transgenen Pflanzen wurden schließlich phänotypisch untersucht. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der NPZ Lembke KG durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Computerprogramme und Internetressourcen

In Tabelle 1 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Computerprogramme aufgelistet, sowie die verwendeten Sequenz- und Geninformationsdatenbanken.

**Tabelle 1** Computerprogramme und Internetdatenbanken

Name	Hersteller, Anbieter	Verwendung
Oligo Analyzer 3.1	Integrated DNA Technologies (Coralville IA)	Design von Oligonukleotiden
Vektor NTI Suite 9	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad CA)	Sequenzanalysen, Alignments, Restriktionsanalysen, Klonierungen
WMD2 Web MicroRNA Designer	MPI für Entwicklungsbiologie (Tübingen)	Design von amiRNAs
Leica Application Suite	Leica (Solms)	Konfokale Lasermikroskopie
Applied Biosystems 7500Fast Software	Applied Biosystems/Life Technologies (Coralville IA)	Quantitative Echtzeit-PCR
DoubleDigest™	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham MA)	Restriktionsverdauung mit zwei Enzymen
Olympus cellSens	Olympus (Tokio)	Digitalfotografie am Stereomikroskop
Zeiss LSM Image Browser	Zeiss (Oberkochen)	Digitalfotografie am Mikroskop
The Arabidopsis Information Resource (TAIR)	Carnegie Institution for Science (Stanford CA)	Internetdatenbank <a href="http://www.arabidopsis.org">www.arabidopsis.org</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	National Institutes of Health (Bethesda MD)	Internetdatenbank <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>



### 2.1.2 Analysesets

Die in dieser Arbeit verwendeten Analysesets sind Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2** Analysesets

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)	Aufreinigung von Pflanzen-RNA
QIAshredder	Qiagen (Hilden)	Extraktion von Pflanzen-RNA
GeneClean II Kit	MP Biomedicals (Santa Ana CA)	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
NucleoSpin Extract II	Macherey Nagel (Düren)	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder von PCR-Produkten
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Fitchburg WI)	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder von PCR-Produkten
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitek (Berlin)	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche (Risch CH)	Herstellung von RNA-Sonden für In-situ-Hybridisierungen
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)	Semiquantitative RT-PCR
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)	Aufreinigung von Plasmiden mit niedriger Kopienzahl

### 2.1.3 Enzyme

Tabelle 3 listet die verwendeten Enzyme. Darüber hinaus wurden auch die Enzyme aus den in Tabelle 2 gelisteten Analysesets verwendet.

**Tabelle 3** Enzyme

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs (Ipswich MA)
<i>Pfu</i> / <i>Taq</i> DNA-Polymerase, rekombinant	AG Schuster (Institut für Angewandte Genetik, FU Berlin)
T4-DNA-Ligase	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham MA)
CIAP-Phosphatase / Fast AP	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham MA)
Gateway <sup>TM</sup> BP-/LR-Clonase Enzyme Mix	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad CA)
Verschiedene Restriktionsendonukleasen	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham MA)
Super Script III	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad CA)
RNAse Out	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad CA)
Immolase DNA-Polymerase	Bioline (Luckenwalde)
Ribonuclease A	Carl Roth (Karlsruhe)

### 2.1.4 Plasmide und Vektoren

Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Klonierungsarbeiten wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Vektoren verwendet.

**Tabelle 4** Plasmidvektoren

<b>Bezeichnung</b>	<b>Funktion</b>	<b>Referenz</b>
pDONR221	Gateway <sup>TM</sup> Entry-Vektor	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad CA)
pDONR P4-P1r	Gateway <sup>TM</sup> Entry-Vektor	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad CA)
pDONR P2r-P3	Gateway <sup>TM</sup> Entry-Vektor	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad CA)
pB7m34GW	Gateway <sup>TM</sup> Expressionsvektor	(Karimi <i>et al.</i> 2005)
pK7m24GW	Gateway <sup>TM</sup> Expressionsvektor	(Karimi <i>et al.</i> 2007)
pKGWFS7	Gateway <sup>TM</sup> Expressionsvektor mit <i>GFP-GUS</i> Fusionsmarkergen	(Karimi <i>et al.</i> 2002)
pGWB4	Gateway <sup>TM</sup> Expressionsvektor mit <i>GFP</i> -Markergen	(Nakagawa <i>et al.</i> 2007)
pJET1	Vektor für JET-Klonierung	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham MA)
pCB302	Binärer Pflanzenvektor	(Xiang <i>et al.</i> 1999)

### 2.1.5 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad CA) bezogen. Zur Auswahl passender Primersequenzen wurde die Online Software OligoAnalyzer 3.1 von Integrated DNA Technologies (Coralville IA) verwendet

### 2.1.6 Bakterienstämme

Die für die Klonierungen und Transformationen verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5** Bakterienstämme

Spezies, Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
<i>Escherichia coli</i> DH10B	(Calvin und Hanawalt 1988; Raleigh <i>et al.</i> 1988)	F- <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1</i>	Plasmidvermehrung von Vektoren mit <i>ccdB</i> Gen
<i>Escherichia coli</i> DH5α	(Hanahan 1983; Raleigh <i>et al.</i> 1989)	F- <i>recA1 endA1 hsdR17 (rk-mk+) supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Plasmidvermehrung, Klonierung
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	(Hanahan 1983; Bernard und Couturier 1992)	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG (Strr)</i>	Plasmidvermehrung, Klonierung
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	(Koncz und Schell 1986)	pMP90, Gm <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup>	Transformation von Pflanzen

### 2.1.7 Pflanzen

Diese Arbeit wurde an *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. (Ackerschmalwand) bzw. an *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* METZG. (Raps) durchgeführt.

Alle Arabidopsispflanzen sind vom Columbia-0 (Col-0) Ökotyp, nur die *clv3-2* Mutante ist im Landsberg *erecta* (*Ler*) Hintergrund. Die verwendeten Arabidopsismutanten sind in Tabelle 6 vermerkt.

Für die Rapsexperimente wurden die Sommerrapssorten Mozart und Kristina (beides Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG) und die doppelt haploide Sommerrapslinie H1 (entstammt dem ehemaligen Labor von Prof. Schieder, FU Berlin, erhalten von Maria Gerdemann, Institut für Angewandte Genetik, FU Berlin) verwendet.

**Tabelle 6** Arabidopsismutanten

<b>Linie</b>	<b>Hintergrund</b>	<b>Referenz</b>
<i>ckx3-1</i> (SALK_050938)	Col-0	(Bartrina <i>et al.</i> 2011)
<i>ckx5-1</i> (SALK_064309)	Col-0	(Bartrina <i>et al.</i> 2011)
<i>ahp6-1</i> (C103T)	Col-0	(Mähönen <i>et al.</i> 2006a)
<i>ahp6-3</i> (SALK_058085)	Col-0	(Mähönen <i>et al.</i> 2006a)
<i>clv3-2</i> (Chromosomenbruch)	<i>Ler</i>	(Fletcher <i>et al.</i> 1999)
<i>wus-4</i> (C133T)	Col-0	(Leibfried <i>et al.</i> 2005, Rüdiger Simon persönl. Mitteilung)
<i>stm-1C</i> (C769T)	<i>Ler</i> 5x rückgekreuzt in Col-0	(Barton und Poethig 1993; Takano <i>et al.</i> 2010)
<i>gor</i> (G1016A)	Col-0	(Takano <i>et al.</i> 2010)
<i>bum1</i> (G906A)	Col-0 ( <i>gll</i> )	(Jasinski <i>et al.</i> 2005)
<i>DR5:GFP</i>	Col-0	(Friml <i>et al.</i> 2003)

## 2.2 Methoden mit lebenden Organismen

### 2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Bakterienkulturen wurden in LB-Flüssigmedium (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7) oder auf LB mit 1,5 % Agar angezogen. *E. coli* Bakterien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, Agrobakterien bei 28°C für zwei Tage. Zur Selektion rekombinanter Plasmide wurden dem Medium entsprechend Antibiotika (Tabelle 7) zugegeben.

Für die *floral-dip* Transformation von Arabidopsis nach Davis *et al.* (2009) wurden Agrobakterien zwei Tage lang in YEB Medium (1 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Rinderextrakt, 5 g/L Saccharose, 5 g/L Pepton, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7) angezogen.

**Tabelle 7** Antibiotika und Herbizide. Gelistet sind die Stoffe, die dem jeweils verwendeten Nährmedium zur Selektion transgener Pflanzen (*Arabidopsis* und Raps) bzw. Bakterien (*E. coli* und *A. tumefaciens*) zugesetzt wurden.

<b>Substanz</b>	<b>Endkonzentration im Medium</b>	<b>Verwendung</b>
Carbenicillin	50 µg/mL	Bakterien
Chloramphenicol	34 µg/mL	Bakterien
Gentamycin	25 µg/mL	Bakterien
Hygromycin	50 µg/mL	Bakterien und Pflanzen
Kanamycin	50 µg/mL	Bakterien und Pflanzen
Phosphinotricin	10 µg/mL	Pflanzen
Rifampicin	50 µg/mL	Bakterien
Spectinomycin	50 µg/mL	Bakterien

### 2.2.2 Herstellung elektrokompenter Zellen

Um elektrokompente *E. coli* Zellen herzustellen wurde eine Vorkultur mit dem entsprechenden Stamm (Tabelle 0) in 5 mL LB angesetzt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde dann mit 2,5 mL der Vorkultur eine 250 mL Hauptkultur gestartet, die bis zum Erreichen einer optischen Dichte  $OD_{600} = 0,6 - 0,8$  bei 37°C geschüttelt wurde. Die folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Hauptkultur wurde in 50 mL Falcons bei 4000 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem destilliertem Wasser wurden die Zellpellets mit 10 % Glycerin gewaschen und schließlich in einem Gesamtvolumen von 5 mL 10 % Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in 50 µL Aliquots bei -80°C eingefroren.

Zur Herstellung elektrokompenter Agrobakterien wurde ähnlich verfahren, mit dem Unterschied, dass die Kulturen bei 28°C geschüttelt wurden und die Hauptkultur ebenfalls über Nacht angezogen wurde.

### 2.2.3 Transformation von Bakterien

In der Regel wurden Bakterien durch Elektroporation transformiert. Aliquote elektrokompenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 -5 µL DNA vermengt und für 30 min auf Eis inkubiert, um eine Anlagerung der DNA an die Zellwände zu ermöglichen. Das Bakterien-DNA-Gemisch

wurde dann in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und bei 1,8 kV elektroporiert. Sofort im Anschluss wurden die Bakterien in 950 µL LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C (*E. coli*) bzw. für zwei Stunden bei 28°C (*A. tumefaciens*) geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde schließlich auf Agarplatten mit LB-Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C (*E. coli*) bzw. für zwei Tage bei 28°C (*A. tumefaciens*) inkubiert.

#### **2.2.4 Kultivierung von Pflanzen**

Arabidopsispflanzen wurden im Gewächshaus auf Erde (2:2:1 P-Erde:T-Erde:Perlite) bei 22°C unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) angezogen. Der Raps wurde in der gleichen Erde bei 25°C kultiviert, ebenfalls unter Langtagbedingungen.

Für die Sterilkultur von Arabidopsis wurden Samen für 15 – 20 min in einer 1,2 % Na-Hypochloridlösung mit 0,001 % TritonX-100 geschüttelt und anschließend unter der Sterilbank dreimal mit autoklaviertem Wasser gewaschen. Die so oberflächensterilisierten Samen wurden in 0,1 % Agarose resuspendiert und mit der Pipette auf ATS Medium (Estelle und Somerville 1987) mit 0,5 % Saccharose und 0,8 % Agar ausgelegt. Zur Selektion transgener Pflanzen wurden dem Medium die entsprechenden Antibiotika bzw. Herbizide (Tabelle 7) beigelegt. Nach der sterilen Aussaat wurden die Petrischalen verschlossen und die Samen für ein bis drei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert, um dann unter Langtagbedingen und 21°C zur Keimung gebracht zu werden. Die Keimlinge wurden nach einer Zeit von 2 - 3 Wochen in Töpfe mit Erde pikiert und im Gewächshaus weiter kultiviert.

Zur Selektion transgener Pflanzen wurde dem Medium entsprechend der Pflanzenresistenz Antibiotika oder Herbizide zugesetzt (Tabelle 7). Bastaresistente Primärtransformanten wurden nicht auf Medium sondern im Gewächshaus auf Erde selektiert. Dazu wurden Keimlinge in großen Schalen mit Erde angezogen und beim Sichtbarwerden der ersten echten Blätter mit wässriger 0,1 % Basta-Lösung besprüht. Die Behandlung wurde nach drei Tagen wiederholt. Resistente Pflanzen wurden dann im Alter von ca. 14 Tagen in Einzeltöpfe pikiert.

#### **2.2.5 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana***

Zum Kreuzen wurden die zwei ältesten noch geschlossenen Blüten der weiblichen Kreuzungspartner benutzt, alle übrigen Knospen und Blüten der Mutterpflanzen wurden abgeschnitten. Die Staubblätter der ausgewählten Blüten wurden entfernt. Die entmannten Blüten wurden bestäubt, indem reife Staubbeutel der männlichen Kreuzungspartner auf die Narbe getupft wurden, bis diese mit ausreichend Pollen bedeckt war.

### **2.2.6 Transformation von *Arabidopsis thaliana***

Arabidopsispflanzen wurden nach dem Protokoll von Davis *et al.* (2009) transformiert, welches auf der *floral-dip* Methode von Clough und Bent (1998) beruht.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Zum einfachen Nachweis von DNA-Sequenzen wurde die *Taq*-Polymerase (Tabelle 3) eingesetzt. Zur Herstellung klonierbarer DNA-Fragmente wurde die korrekturlesende *Pfu*-Polymerase verwendet, oder, wenn mit dieser kein Produkt hergestellt werden konnte, die *Phusion High-Fidelity Polymerase* (s. Tabelle 3).

Alle PCR-Läufe wurden mit *Pfu*- oder *Taq*-Polymerase bei einer  $Mg^{2+}$  Konzentration von 2 mM durchgeführt. Die Zusammensetzung der entsprechenden PCR-Puffer ist Sambrook und Russel (2001) zu entnehmen. Primer wurden normalerweise bei einer Endkonzentration von 0,5  $\mu M$  eingesetzt, die dNTP Konzentration betrug pro Nukleotidsorte 0,2 mM. Die Reaktionen mit der *Phusion* Polymerase wurden entsprechend der Herstellervorgaben durchgeführt.

### **2.3.2 Agarosegelelektrophorese**

Zur Auftrennung und Detektion von DNA bzw. RNA wurden die Proben auf Agarosegele in Horizontalelektrophoresekammern aufgetragen. Der Agarosegehalt der Gele betrug je nach Fragmentgröße 1 – 3 %, als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) benutzt. Als Nukleinsäuremarker wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid zu einer Konzentration von 200 ng/mL beigemischt. Als Größenstandard wurde meist HyperLadder I (Bioline, Luckenwalde) mit auf das Gel aufgetragen. Spannung und Laufzeit lagen je nach Gelgröße und -konzentration zwischen 70 – 140 mV und 20 – 90 min. Die Nukleinsäuren wurden nach Ende des Elektrophoreselaufs im UV-Licht detektiert und fotografiert.

### **2.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

Sollte eine bestimmte DNA-Bande aus einem Agarosegel extrahiert werden, wurde die Bande auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte anschließend entweder mit dem Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System oder Macherey und Nagel NucleoSpin Extract II Kit (s. Tabelle 2).



### 2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde entweder mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit (Tabelle 2) nach Herstellerangaben durchgeführt oder nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979). Für letztere Methode wurden 2 mL Bakterienkultur abzentrifugiert (1 min, 16000 g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µL P1-Puffer (24 mM Tris/HCl pH8, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase) resuspendiert und dann durch Zugabe von 500 µL P2-Puffer (0,2 N NaOH, 1 % SDS) für 5 min auf Eis lysiert. Die Lyse wurde mit 350 µL P3-Puffer (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) gestoppt. Der Extraktionsansatz wurde dann für 5 min bei 16000 g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 850 µL Isopropanol wurde die DNA schließlich gefällt, 30 min bei 16000 g abzentrifugiert und als Pellet in 70 % Ethanol gewaschen. Zum Schluss wurde das getrocknete Pellet in 30 mL destilliertem Wasser gelöst.

### 2.3.5 Klonierung

Fast alle Konstrukte wurden im Gateway™- oder MultiSite Gateway™-System (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad CA) hergestellt. Die dafür verwendeten *att*-Sequenzen sind dem MultiSite Gateway® Pro Handbuch zu entnehmen. Das *pCLV3:GFP* Konstrukt wurde nach dem Prinzip der klassischen Klonierung (DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen, Aufreinigung der Fragmente, Dephosphorylierung des offenen Vektors mit CIAP, Ligation mit T4 Ligase, s. Sambrook und Russell 2001) hergestellt.

Im Folgenden werden die Klonierungsstrategien für alle in dieser Arbeit erstellten Konstrukte erläutert. Die verwendeten Primer sind dem Anhang (Tabelle 20, Tabelle 21) zu entnehmen.

#### 2.3.5.1 Klonierung von *AHP6*

Um eine DNA-Vorlage für die Herstellung einer RNA-Sonde zu erhalten, wurde Arabidopsis-RNA aus Keimlingen in eine One-Step RT-PCR (s. Abschnitt 2.3.10) eingesetzt und mit den Primern *AHP6-F/-R* die *AHP6* cDNA amplifiziert. Das 465 bp lange Fragment wurde per PCR mit den Sequenzen *attB1* und *attB2* versehen und in pDONR221 kloniert.

#### 2.3.5.2 Klonierung der *Brassica CKX3*, *CKX5* und *CLVI* Sequenzen

Das *BraCKX5* Gen wurde mit den Primern *BrCKX5-F/-R* von dem BAC-Klon KBrH012I05 (GeneBank-Nr. AC189586.2) amplifiziert. Für die folgende Gateway-Klonierung wurde das PCR-Produkt in einer weiteren Amplifikation mit den *att*-Sequenzen *attB1* und *attB2* versehen (Primer

BrCKX5-F-attB1 und BrCKX5-R-attB2). Anschließend wurde das Gen in einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR221 eingefügt.

Die cDNA-Sequenzen *BolCKX3*, *BraCKX3*, *BolCKX5* und *BraCKX5* wurden in einer One-Step RT-PCR (2.3.10) aus Keimlings-RNA amplifiziert. Als Primer wurden BrCKX5-F/-R und BnCKX3-F/-R verwendet. Die PCR-Produkte wurden ebenfalls mit *attB1*- und *attB2*-Sequenzen versehen und in pDONR221 kloniert. Auf die gleiche Weise wurde ein 989 bp langes Teilstück der *Bol/BraCLV1* cDNAs kloniert, als Primer wurden BnCLV1-iF-2020 und BnCLV1-R verwendet. Auf Basis dieses Fragments wurde später die Sonde für die Positivkontrolle der In-situ-Hybridisierungen erstellt.

Die Längen aller Brassicasequenzen sind Tabelle 13 zu entnehmen.

### 2.3.5.3 Klonierung der *antiCKX3* und *antiCKX5* amiRNA-Sequenzen

Für das Design der amiRNAs (artificial microRNAs) wurde die Onlinesoftware WMD2 (Tabelle 1, Schwab *et al.* 2006; Ossowski *et al.* 2008) verwendet. Als Berechnungsgrundlage wurden jeweils die beiden in Abschnitt 2.3.5.2 erwähnten *CKX3* bzw. *CKX5* cDNA-Sequenzen aus *B. rapa* und *B. oleracea* in das Programm eingegeben. Für die vom Programm vorgesehene BLAST-Funktion wurde die *B. napus* EST Datenbank BnG1-2.0 ausgewählt.

Es wurden jeweils zwei amiRNAs gegen *CKX3* (*antiCKX3.1/2*) und gegen *CKX5* (*antiCKX5.1/2*) entworfen (amiRNA-Sequenzen s. Tabelle 17). Die verwendeten Primer tragen die Bezeichnung *antiCKX3/5.1/2* I – IV (s. Anhang, Tabelle 20). Die Amplifikation des amiRNA Vorprodukts (Englisch: *Precursor*) erfolgte durch überlappende PCR gemäß der Anleitungen auf der WMD2 Website. Als PCR-Matrize diente das von der AG Weigel (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) zur Verfügung gestellte Plasmid pRS300 (ausführliche Hinweise zu diesem Plasmid auf [wmd2.weigelworld.org](http://wmd2.weigelworld.org)).

Die fertigen amiRNA-Precursor wurden per PCR mit den *att*-Sequenzen *attB1/attB2* (*antiCKX5* amiRNAs) bzw. *attB2r/attB3* (*antiCKX3* amiRNAs) versehen und in die Vektoren pDONR221 und pDONR P2r-P3 kloniert.

Der *p35S* Promotor wurde mit den Primern *p35S-F/R* von dem Vektor PGWB15 (Nakagawa *et al.* 2007) amplifiziert, mit den *att*-Sequenzen *attB4* und *attB1r* versehen und in den Vektor pDONR P4-P1r kloniert.

In einer Multisite-LR-Reaktion wurden je eine *antiCKX5* und eine *antiCKX3* amiRNA hinter den *p35S* Promotor in den Vektor pB7m34GW kloniert.

### 2.3.5.4 Klonierung der meristemdomänenspezifischen Konstrukte

Bei den meristemdomänenspezifischen Konstrukten handelt es sich um neun verschiedene Promotor-Gen-Kombinationen, die sich aus je einem von drei verschiedenen, im SAM aktiven Promotoren und

einem von drei Genen aus dem Cytokininkontext zusammensetzen. Die Promotoren wurden alle in einer PCR mit den *att*-Sequenzen *attB4* und *attB1r* versehen und per BP-Reaktion in den Vektor pDONR P4-P1r subkloniert. Die Gensequenzen lagen bereits fertig kloniert in pDONR-Vektoren des Gateway-Systems vor.

- Die 5648 bp lange Promotorsequenz von *pCLV1* (3 bp stromaufwärts vom *CLV1* Startcodon, *Ler* Genotyp) wurde von dem Plasmid pKR126 (Schoof *et al.* 2000) amplifiziert (Primer pCLV1-F/-R).
- Der Promotor von *CLV3* (1451 bp lang, Start 33 bp stromaufwärts vom *CLV3* Startcodon, Col-0 Genotyp, nach Brand *et al.* 2002) wurde von dem Konstrukt *pCLV3:CKX1-GFP* (Holst 2009) amplifiziert. Da für die Funktion von *pCLV3* ein Teil der 3' UTR vorhanden sein muss (Brand *et al.* 2002), wurde der 1286 bp lange *tCLV3* Terminator (Beginn direkt nach dem Stopcodon von *CLV3*) mit dem Primern tCKV3-F/-R von dem gleichen Konstrukt amplifiziert und, versehen mit den Sequenzen *attB2r* und *attB3*, in den Vektor pDONR P2r-P3 kloniert.
- Die 1723 bp *pWUS* Sequenz (*Ler* Sequenz, direkt ab *WUS* Startcodon, Grandjean *et al.* 2004) wurde von dem Plasmid *pWUS:CKX1-GFP* (Holst 2009) mit den Primern pWUS-F/-R amplifiziert.
- Die *ARR1-SRDX* Sequenz (2031 bp, *ARR1* cDNA + *SRDX* cDNA, C24 Genotyp) lag in dem Plasmid pDONR201:ARR1-SRDX (Heyl *et al.* 2008) vor.
- Die genomische Sequenz von *CKX1* (2236 bp, Werner *et al.* 2001) lag in dem Plasmid pDONR221/CKX1 (AG Werner, Col-0 Genotyp) vor.
- Die genomische Sequenz von *ROCK2* (4595 bp, *AHK2* mit 218C>T Mutation, Col-0 Genotyp) lag in dem Plasmid pDONR221/ROCK2 (Braun, unveröffentlicht, Doktorarbeit) vor.

Anschließend wurden diese sieben pDONR-Konstrukte in verschiedene Multisite-LR-Reaktionen eingesetzt, um verschiedene Destinationsvektoren zu erhalten. Die dadurch entstandenen Konstrukte sind Tabelle 8 zu entnehmen.

**Tabelle 8** Liste meristemdomänenspezifischen Konstrukte. Die Herstellung erfolgte durch Multisite-LR-Klonierung.

**Plasmidname**

---

pK7m24GW/pCLV1:ARR1-SRDX

pK7m24GW/pCLV1:CKX1

pK7m24GW/pCLV1:ROCK2

---

pB7m34GW/pCLV3:ARR1-SRDX:tCLV3

pB7m34GW/pCLV3:CKX1:tCLV3

pB7m34GW/pCLV3:ROCK2:tCLV3

---

pK7m24GW/pWUS:ARR1-SRDX

pK7m24GW/pWUS:CKX1

pK7m24GW/pWUS:ROCK2

### 2.3.5.5 Klonierung des *pCLV3:GFP* Konstrukts

Für die Erstellung des *pCLV3:GFP* Konstrukts wurde in einem ersten Schritt der *pCLV3* Promotor aus dem pDONR P4-P1r Plasmid in den Destinationsvektor pKGWFS7 subkloniert. Das daraus entstandene pCLV3/pKGWFS7-Plasmid enthält stromabwärts der *pCLV3*-Sequenz ein gekoppeltes *GFP/uidA* Gen, gefolgt von einem *tNOS* Terminator. Für die Funktionalität des *pCLV3* Promotors ist jedoch die Sequenz des *tCLV3*-Terminators essentiell (Brand *et al.* 2000). Diese wurde daher nachträglich in pCLV3/pKGWFS7 hineinkloniert. Dafür wurde die *tCLV3*-Sequenz mit dem Primerpaar tCLV3-F-NcoI/-R-AatII per PCR amplifiziert und anschließend mit *NcoI* und *AatII* verdaut. Das pCLV3/pKGWFS7 Plasmid wurde ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen verdaut. Dadurch entstanden drei Fragmente (8324 bp, 3915 bp, 260 bp) von denen das kleinste, das den *nos*-Terminator enthielt, verworfen wurde. Die beiden großen Fragmente wurden mit dem *tCLV3* Promotor ligiert, so dass der Vektor pCLV3/pKGWFS7/tCLV3 entstand.

### 2.3.6 DNA-Restriktionsverdau

Restriktionsverdaue wurden grundsätzlich zuerst *in silico* mit dem Programm VectorNTI (Tabelle 1) durchgeführt, um geeignete Enzyme auszuwählen und die zu erwartende Länge der DNA-Fragmente zu ermitteln. Für die anschließenden Verdaue wurden die konventionellen Restriktionsenzyme der Firma Fermentas (Tabelle 3) benutzt und die Reaktionsansätze gemäß der Herstellerangaben pipettiert.

Für Verdau mit mehreren Enzymen wurde die ideale Puffer/Enzym-Zusammenstellung mit Hilfe des Programms DoubleDigest (s. Tabelle 1) ermittelt.

PCR-Produkte wurden für einen anschließenden Verdau nicht aufgereinigt sondern direkt in einem Reaktionsansatz aus 10 µL PCR-Produkt, 8 µL H<sub>2</sub>O, 1 µL Reaktionspuffer und 1 µL Restriktionsenzym verwendet. Für einfache Kontrollverdau von Plasmiden wurde wenn möglich 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt, für andere Verdau wurde der Verwendung entsprechend die DNA-Menge angepasst.

### **2.3.7 Sequenzierung**

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG aus Konstanz nach der Sanger Methode (Sanger *et al.* 1977) durchgeführt. Plasmid-DNA wurde für die Sequenzierungen ausschließlich mit dem Invitek Kit (s. Tabelle 2) aufgereinigt, da aus der alkalischen Lyse erhaltene DNA nicht rein genug für eine Sequenzierung ist.

### **2.3.8 DNA-Extraktion aus Pflanzen**

DNA aus Pflanzen wurde abgewandelt nach der *Quick Prep* Methode von Weigel und Glazebrook (2002) extrahiert. Ca. 0,25 – 0,5 cm<sup>2</sup> Blattmaterial wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 200 µL Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA) geerntet und mit Hilfe einer Stahlkugel für 2 x 2 min in einer MM 300 Schwingmühle (Retsch, Haan) aufgeschlossen. Anschließend wurde den Proben SDS zu einer Konzentration von 0,5 % zugegeben und das Gemisch auf dem Vortex gut vermenget. Nach fünfminütiger Zentrifugation (16000 g) wurde der Überstand in eine neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µL Isopropanol durch Invertieren vermischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 16000 g wurde das Pellet aus gefällter DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µL TE Puffer (10 Mm Tris/HCl pH8, 1 mM EDTA) über Nacht bei 4°C gelöst. In PCRs wurde jeweils 1 µL dieser DNA eingesetzt.

### **2.3.9 RNA-Extraktion aus Pflanzen**

Pflanzen-RNA wurde entweder gemäß Herstellerangaben mit dem QIAshredder Kit (s. Tabelle 2) oder nach der Trizol-Methode extrahiert. Für letztere Methode wurden 100 – 200 mg Pflanzenmaterial von Hand unter flüssigem Stickstoff oder Stickstoff-gekühlt in der Retsch MM 300 Schwingmühle gemörsert. Auf das unaufgetaute Pflanzenpulver wurde 1 mL Trizol (38 % Phenol, 800 mM Guanidiniumthiocyanat, 400 mM Ammoniumthiocyanat, 100 mM Natriumacetat, 5 % Glycerin) gegeben und mit der Probe vollständig vermenget. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 16000 g, 4°C), dann wurde der Überstand in einem neuen

Reaktionsgefäß mit 400 µL Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) vermischt und wieder für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch erneute Zentrifugation (15 min, 16000 g, 4°C) trennte sich das Gemisch in eine organische Unter-, eine Inter- und eine wässrige Oberphase auf. Die Oberphase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 350 µL Isopropanol und 350 µL Hochsalzlösung (1,2 M Natriumchlorid, 800 mM Natriumcitrat) durch invertieren vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so gefällte RNA wurde abzentrifugiert (10 min, 16000 g, 4°C) und das dadurch erhaltene RNA-Pellet zweimal mit je 1 mL 70 % Ethanol gewaschen, dann getrocknet und in 100 µL bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Nach der Extraktion wurden Quantität und Qualität der RNA auf dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (peqlab, Erlangen) bestimmt, dann wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (s. Tabelle 2) weiter gereinigt.

### **2.3.10 Semiquantitative RT-PCR**

Um die relative Expressionsstärke von Transgenen ungefähr zu bestimmen, wurde extrahierte Pflanzen-RNA in einer semiquantitative RT-PCR eingesetzt. Dafür wurde das OneStep RT-PCR Kit (s. Tabelle 2) entsprechend der Herstellerangaben benutzt.

### **2.3.11 cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese wurde mit der Reversen Transkriptase SuperScript III (Tabelle 3) durchgeführt. In einem Voransatz wurden anfangs 5 µg, später nur noch 3 µg oder 1 µg RNA mit bidestilliertem sterilem Wasser auf 8 µl aufgefüllt, mit 2 µL dNTPs (5 mM pro Sorte), 1 µL Oligo dT<sub>25</sub> (50 µM) und 1,8 µL Random-N9 Primer (50 µM) vermischt und im PCR-Block für 5 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde die Probe für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Der Ansatz wurde dann mit 4 µL 5x Superscript Puffer (vom Hersteller), 1 µL 0,1 M DTT, 1 µL RNase out und 1 µL Superscript III auf 20 µL aufgefüllt, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und zurück in den PCR-Block gestellt. Die Reaktion wurde mit folgender Zeit/Temperatur Folge fortgesetzt: 5 min bei 25°C, 1 h bei 60°C, 15 min bei 70°C.

Sollte die cDNA für eine qRT-PCR (s. Abschnitt 2.3.12) verwendet werden, wurden die Proben nach der Synthese 1:20 verdünnt.

### **2.3.12 Quantitative Echtzeit-PCR**

Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) wurde durchgeführt, um das mRNA-Niveau bestimmter Gene zu untersuchen. Die Genexpression wurde dabei immer im relativen Verhältnis zum Expressionsniveau eines Haushaltsgens gemessen (Methode der relativen Quantifizierung). Als

Haushaltsgen wurde für Arabidopsis entweder *PDF1*, das für die 65 kDa regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (At3g25800) codiert, oder *UBC10*, die Ubiquitin-Protein-Ligase (At5g53300), gewählt. Für die *Brassica* qRT-PCRs wurde als Referenzgen *TIP41* (Arabidopsisortholog At4g34270) verwendet (Chen *et al.* 2010).

Alle qRT-PCRs wurden in einem Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Block durchgeführt. Dafür wurden die Reaktionen nach dem Schema in Tabelle 9 angesetzt und in 96er Lochplatten (Multiwellplatten) pipettiert. Jede Reaktion wurde in drei identischen, parallelen Ansätzen, sogenannten technischen Replikaten oder Triplikaten, angelegt. Das zugehörige PCR-Programm ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Um eine gute Vergleichbarkeit aller PCR-Ansätze in einer Platte zu gewährleisten, wurde für alle Reaktionen ein gemeinsamer Mastermix ohne cDNA und Primer hergestellt. Der Mix wurde für die verschiedenen Primerkombinationen aufgeteilt und mit den entsprechenden Oligonukleotiden versetzt. Dieser zweite Mastermix wurde dann in Aliquots für die Triplikatgruppen aufgeteilt, mit der verdünnten cDNA vermischt und schließlich auf jeweils drei Vertiefungen der Multiwellplatte verteilt. Es wurden 3,5 µL verdünnte cDNA pro Reaktionsansatz verwendet (bzw. 2 µL, wenn die cDNA aus 5 µL RNA/RT-Reaktion hergestellt worden war).

Die Primer zur Ermittlung der Expression des transgenen *ROCK2* Gens wurden vor ihrer Verwendung auf ihre Effizienz geprüft. Dieses Experiment wurde mit der Methode der absoluten Quantifizierung durchgeführt, bei der verschiedene Primer- (150/300/500 nM) und cDNA-Konzentrationen (20/10/5/2,5/1,25/0,625/0,3125 ng/Reaktion) in eine qRT-PCR eingesetzt werden. Die zusätzliche Expressionsmessung eines Haushaltsgens ist nicht nötig. Für jede PCR wurde anschließend der Zyklus bestimmt, nach dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über der Hintergrundfluoreszenz lag. Dieser Zyklus wird als Schwellenwert-Zyklus  $C_T$  (Englisch: *Cycle threshold*) bezeichnet. Der  $C_T$  Wert wurde gegen die absolute Quantität des Fluoreszenzsignals aufgetragen, um eine Standardkurve zu erhalten. Anhand der Steigung dieser Kurve konnte schließlich die Effizienz des Primerpaars abgelesen werden. Ist diese kleiner als 80 %, müssen die PCR-Bedingungen angepasst oder neue Primer entworfen werden. Liegt die Effizienz über 80 %, sind die Primer für qRT-PCRs nach dem Prinzip der relativen Quantifizierung geeignet.

**Tabelle 9** Reaktionsansatz für qRT-PCR.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration in der qRT-Reaktion</b>
Immolase DNA-Polymerase (Bioline, Luckenwalde)	0,01U/ $\mu$ L
Immolase-Puffer (Bioline, Luckenwalde)	1 x
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dATP/dTTP/dCTP/dGTP	100 $\mu$ M
SYBR Green I	0,1 x
ROX	50 nM
Primer 1 und Primer 2	jeweils 300 nM
cDNA	1,25 oder 1,125 ng/ $\mu$ L

**Tabelle 10** qRT-PCR Programm

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Laufzeit</b>
1. Aktivierung der Immolase	95°C	15 min
2. Denaturierung der DNA-Matrize	95°C	10 s
3. Anlagern der Primer an die Matrize	55°C	15 s
4. Amplifikation mit anschließender Fluoreszenzmessung	72°C	10 s
5. Schmelzkurve mit 1 % Heizrate	60 – 95°C	–
Anzahl der Zyklen (Schritt 2. – 4.)	–	40 x

## 2.4 Histologische Methoden

### 2.4.1 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axioskop 2 Plus mit einer AxioCam ICc3 Kamera angefertigt. Die Bilder wurden im Zeiss LSM Image Browser (Tabelle 1) bearbeitet.

Mikropräparationen und Aufnahmen mit geringer Vergrößerung wurden an einem Olympus SZX12 Stereomikroskop durchgeführt. An das Gerät war eine Kamera vom Typ Olympus UC30 angeschlossen, als Software wurde das Programm Olympus cellSens (Tabelle 1) verwendet.



### **2.4.2 Toluidinblaufärbung**

Sprossquerschnitte von *Arabidopsis* wurden mit Toluidinblau angefärbt, um die unterschiedlichen Zellwandtypen farblich voneinander abzugrenzen (O'Brien *et al.* 1964). Dafür wurden die Sprosse direkt oberhalb der Rosette gerade abgeschnitten und auf ca. 1 cm heruntergekürzt. Das obere Ende des Sprosstücks wurde schräg angeschnitten, so dass später eine Unterscheidung zwischen oberem und unterem Ende möglich war. Die Stücke wurden wie in Kapitel 2.4.6.2 beschrieben in Wachs eingebettet und am Mikrotom geschnitten. Zum Entfernen des Paraffins wurde das Protokoll der In-situ-Hybridisierung (Kapitel 2.4.6.3) bis zum Ende der ersten Ethanolreihe befolgt. Die Objekte wurden aus dem Wasser genommen und mit 100  $\mu$ L einer Lösung aus 0,05 % Toluidinblau und 0,05 % Borat beträufelt. Nach einigen Sekunden wurde die Färbelösung mit Wasser abgewaschen und durch 50 % Glycerin ersetzt. Die Objekte wurden mit Deckgläschen bedeckt und am Stereomikroskop fotografiert.

### **2.4.3 Gewebeentfärbung**

Um die Samenanlagen in Gynocien zählen zu können, wurden junge Schoten geerntet und gebleicht. Die Entfärbung wurde nach dem Protokoll von Malamy und Benfey (1997) durchgeführt, wobei das Hydroxylamin-HCl weggelassen wurde. Zusätzlich wurde das Gewebe direkt vor der Entfärbung für 20 – 30 min mit einem 6:1 Ethanol-Essigsäure Gemisch fixiert und anschließend für je 5 min zuerst in 70 %, dann in 40 % Ethanol inkubiert. Das gebleichte Gewebe wurde im Lichtmikroskop untersucht.

### **2.4.4 Lasermikroskopie**

Infloreszenzmeristeme von Pflanzen, die ein fluoreszierendes Reportergen exprimierten, wurden nach einem abgewandelten Protokoll von Grandjean *et al.* (2004) vorbereitet und in einem konfokalen Breitbandlasermikroskop (Leica TCS SP5) untersucht.

Die Infloreszenzen von 3 - 8 cm hohen *Arabidopsis*pflanzen wurden abgeschnitten und unter dem Binokular mit scharfen Kanülen präpariert. Dabei wurden so viele Knospen entfernt, dass das SAM gut sichtbar war. Um die Zellmembranen anzufärben (Bolte *et al.* 2004) wurden die präparierten Infloreszenzen für ca. 10 min kopfüber in Leitungswasser mit 50  $\mu$ M SynaptoRed<sup>TM</sup> C2 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) auf Eis inkubiert und anschließend kurz in Leitungswasser gewaschen. Der oberste Sprossteil mit dem Meristem wurde dann auf eine Länge von maximal 1 mm gekürzt. Ein Deckgläschen wurde mit einer 1 mm dicken, gelochten Silikonmatte belegt und die Probe in eines der Mattenlöcher gelegt. Das Loch wurde mit 1 % Agar aufgefüllt und das Präparat darin so ausgerichtet, dass die Meristemoberfläche zum Deckgläschen zeigte. Die eingebettete Probe mit dem Gläschen

wurde dann mit einem Tropfen Wasser benetzt, umgedreht, auf einem Objektträger positioniert und im Lasermikroskop untersucht.

Aufnahmen des SAM wurden mit dem 20 x vergrößernden Objektiv gemacht. Bildserien wurden mit der Z-Stapelfunktion der Leica Software aufgenommen (30 – 50 Bilder, Bildabstand 0,5 -2 µm, Frame Average 8, Frequenz 400 Hz, Format 512 x 512 Pixel) und im gleichen Programm nachbearbeitet (Kontrastverstärkung, Zuschchnitt, 3D-Projektion).

Das SynaptoRed wurde mit Laserstrahlen einer Wellenlänge von 488 nm, 514 nm oder 561 nm angeregt und die rote Fluoreszenz bei 700 – 800 nm (Maximum 740 nm) detektiert. GFP wurde mit dem Argon-Laser bei 488 nm angeregt und die Emission zwischen 490 nm – 500 nm gemessen. Eine Fluoreszenzmessung in der Nähe des GFP Emissionsmaximums von 509 nm war nicht möglich, da die Proben oberhalb von 500 nm stark autofluoreszierten. Das tdTomato-Protein wurde mit dem DPSS561 Laser bei 561 nm angeregt und die Emission bei 570 -590 nm gemessen.

#### **2.4.5 Raster-Elektronenmikroskopie**

Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Infloreszenzmeristeme und vegetative Meristeme freipräpariert und für 24 h in einer FAA-Lösung (2 % Formalin, 2 % Essigsäure, 45 % Ethanol) fixiert. Die Präparate wurden dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und in Aceton überführt.

Alle folgenden Schritte wurden mit Hilfe von Christine Grüber (Institut für Systematische Botanik, FU Berlin) durchgeführt. Die Proben wurden Kritisch-Punkt-getrocknet, mit Gold bedampft (Sputter Coater SCD 050, Blazers) und in einem Leo 430 Elektronenmikroskop (Zeiss) fotografiert.

#### **2.4.6 In-situ-Hybridisierung**

##### **2.4.6.1 Erstellung der RNA-Sonde**

Die In-vitro-Transkription der Sonde sowie die Hydrolyse und der anschließende Dot-Blot erfolgten in Anlehnung an die Protokolle von Brewer *et al.* (2006) und Kidner *et al.* (2006).

Für die Erstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde wurde das DIG RNA Labeling Kit von Roche benutzt. Zuerst wurde per PCR eine Matrize für die Reverse Transkription erstellt, die entweder am 5'- oder am 3'-Ende die 15 bp lange Sequenz des T7-Polymerase Promotors trug. Befand sich der Promotor am 5'-Ende des PCR-Produkts, wurde eine *sense*-Sonde transkribiert, die, bis auf den T7-Promotor, sequenzidentisch mit der anvisierten mRNA war und mit dieser folglich nicht hybridisieren kann. Die *sense*-Sonde wird als Negativkontrolle für die Hybridisierung eingesetzt. Ist der T7-Promotor am 3'-Ende des PCR-Produkts lokalisiert, wird während der reversen Transkription eine zur

Ziel-mRNA komplementäre *antisense*-Sonde synthetisiert, die später im Gewebe mit der mRNA hybridisiert und diese farblich detektierbar macht.

Als PCR-Matrize für die *AHP6*-Sonde diente *AHP6* cDNA aus Keimlingen (Vektor pDONR221-AHP6). Die *WUS*-Sonde basierte auf dem cDNA-Vektor PENTR221-AT2G17950 (GenBank Nummer DQ446515). Für die Brassicasonden wurde *BraCKX3* cDNA (Vektor pDONR221-BraCKX3) bzw. *BraCKX5* cDNA (Vektor pDONR221-BraCKX5) als Matrizen benutzt. Die Positivkontrolle *BraCLV1* wurde anhand des cDNA-Vektors pDONR221-BraCLV1-Teil amplifiziert.

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und wie vom Hersteller des Kits angegeben in einer reversen Transkription mit der T7-Polymerase eingesetzt. Um die Matrizen-DNA zu entfernen, wurden direkt nach der zweistündigen Transkription 85  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 10  $\mu\text{L}$  tRNA (20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) und 5 U DNase (aus dem Kit) zum Reaktionsansatz gegeben und das Ganze für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100  $\mu\text{L}$  Ammoniumacetat (4 M) und 200  $\mu\text{L}$  reinem Ethanol abgestoppt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die gefällte RNA abzentrifugiert und, wie in Kidner *et al.* (2006) beschrieben, auf eine Länge von 150 bp hydrolysiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls nach diesem Protokoll.

Um die Konzentration der DIG-markierten RNA-Sonde ungefähr abschätzen zu können, wurde nach Abschluss der Sondensynthese ein Dot-Blot durchgeführt. Dafür wurde das Protokoll von Brewer *et al.* (2006) befolgt.

#### **2.4.6.2 Einbettung und Schneiden von Pflanzengewebe**

Pflanzenmaterial wurde, wie in Kidner *et al.* (2006) beschrieben, geerntet und in Wachs (Paraplast X-tra, Roth, Karlsruhe) eingebettet. Die Eosin-Färbung des Gewebes (Anfärbung der basischen Zellbestandteile, v.a. der Proteine des Zytoplasmas) erfolgte bereits über Nacht, direkt im Anschluss an die dehydrierende Alkoholreihe.

Gewebeschnitte wurden an einem Leica RM2255 Rotationsmikrotom durchgeführt, bei einer Schnittdicke von 8  $\mu\text{M}$ . Die geschnittenen Wachsbänder wurden in ein ca. 35°C warmes Wasserbad gegeben und von dort auf positiv geladene Objektträger übertragen. Die Objekte wurden auf einer 42°C warmen Heizplatte ausgelegt und dort über Nacht getrocknet.

#### **2.4.6.3 Hybridisierung und Färbung**

Die Vorbereitung der Schnitte für die Hybridisierung, die In-situ-Hybridisierung selbst und die Behandlung danach wurden wie in Kidner *et al.* (2006) beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass an dem Tag nach der Hybridisierung die RNase Behandlung und sämtliche Waschschrte mit NTE-Puffer weggelassen wurden. Die Hybridisierung mit dem Anti-DIG Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche, Risch CH) erfolgte für zwei Stunden bei

Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen wurden die Objekte für 10 min in Detektionspuffer (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) inkubiert, dann mit Western Blue Lösung (Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase, Promega, Fitchburg WI) beträufelt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung mit Detektionspuffer abgewaschen und die Schnitte in 50 % Glycerin im Mikroskop betrachtet.

Anstatt wie im Protokoll vermerkt bei der Hybridisierung der Antikörperbindung und der Farbreaktion immer zwei Objektträger zusammenzuklappen, wurden die Objekte mit speziellen Deckgläschen (HS6024-CS-HybriSlip Hybridization Cover, Grace Bio-Labs, Bend OR) zugedeckt

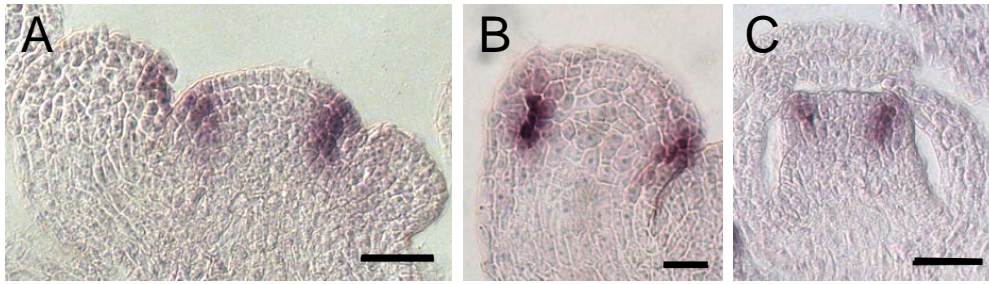
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Arabidopsis *ckx3 ckx5 ahp6* Dreifachmutante

Wie in der Einleitung beschrieben, entwickeln *ckx3 ckx5* Knockoutpflanzen vergrößerte Infloreszenzmeristeme, die mehr Blüten produzieren als Wildtyppflanzen (Bartrina 2006; Bartrina *et al.* 2011). Dieser Phänotyp ist auf mehr Cytokinin im SAM zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erforscht, ob eine weitere Erhöhung des Cytokininstatus im SAM noch größere und produktivere Meristeme generiert. Da durch das Ausschalten von *CKX3* und *CKX5* der Cytokininhalt im SAM bereits erhöht worden war, wurde nun versucht, durch die zusätzliche Verstärkung des Cytokininsignalübertragungswegs einen additiven Effekt zu erzeugen. GUS-Färbungen (Mähönen *et al.* 2006a) wiesen darauf hin, dass *AHP6*, ein bis dahin nur aus Wurzeln bekannter negativer Regulator des Cytokininsignals, im SAM aktiv sein könnte. Daher wurden zwei *ahp6* Nullallele, *ahp6-1* und *ahp6-3* (Mähönen *et al.* 2006a), in *ckx3 ckx5* Pflanzen eingekreuzt und homozygote Nachkommen aller möglichen Knockoutkombinationen untersucht. Die Meristemphänotypen der *ahp6-1* und *ahp6-3* Mutanten waren nahezu identisch und auch in Kombination mit den *ckx* Knockouts zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Allelen. Aus diesem Grund werden hier, mit Ausnahme von Abbildung 8B, nur die Ergebnisse der Dreifachmutanten mit dem *ahp6-1* Allel gezeigt.

##### 3.1.1 *AHP6* In-situ-Hybridisierung im Infloreszenzmeristem von Arabidopsis

Um zu erfahren, ob und wo genau im Sprossmeristem das *AHP6* Gen exprimiert wird, wurden In-situ-Hybridisierungen mit DIG-markierten RNA-Sonden durchgeführt. *AHP6* mRNA wurde an den Meristemseiten, den sogenannten P<sub>0</sub> Stellen oder Initien, an denen sich die nächsten Primordien bilden werden (Abbildung 6A), detektiert. Auch in ganz jungen Primordien (Stadium 1, nach Smyth *et al.* 1990) ist das Gen aktiv. Außerdem konnte *AHP6* Transkription in Blütenorganprimordien von Blüten in Stadium 3 und an den distalen Enden von sich entwickelnden Gynoecien (Stadium 6) nachgewiesen werden (Abbildung 6B + C).



**Abbildung 6** Lokalisierung von *AHP6* mRNA in Arabidopsis Wildtypgewebe durch In-situ-Hybridisierung.

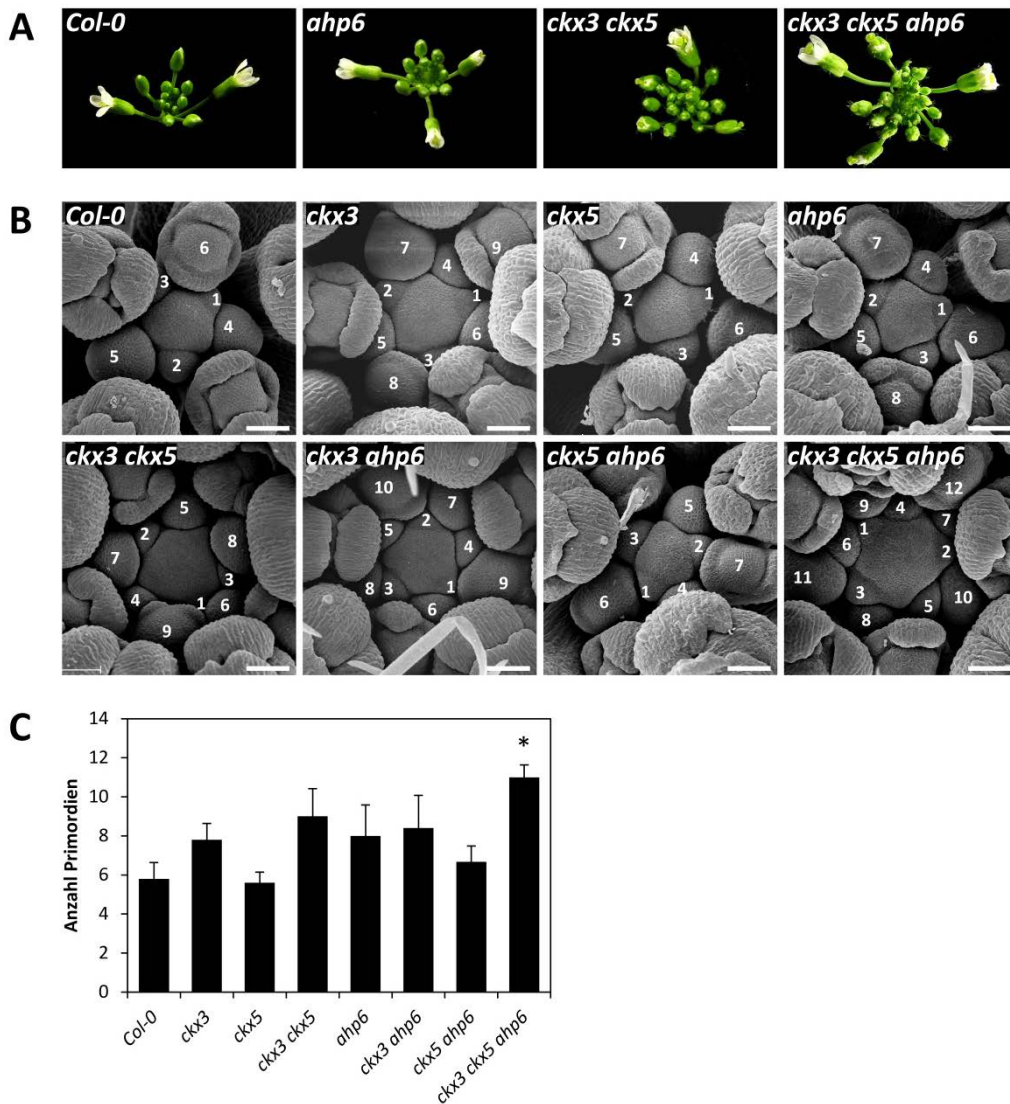
(A) *AHP6* wird im Infloreszenzmeristem an den Positionen  $P_0$  und  $P_1$  exprimiert, sowie (B) in Blütenorganprimordien von Blüten in Stadium 3 und (C) an der Spitze sich entwickelnder Gynoecien von Blüten in Stadium 6. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ , Einteilung der Blütenstadien nach Smyth *et al.* (1990)

### 3.1.2 Untersuchung der Infloreszenzmeristeme von *ckx3 ckx5 ahp6* Mutanten

Da bekannt war, dass *ckx3 ckx5* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp größere Infloreszenzen und Meristeme bilden (Bartrina 2006), wurden auch die *ahp6* bzw *ckx ahp6* Mutanten dahingehend untersucht. Abbildung 7A zeigt die Infloreszenzen der verschiedenen Mutanten. Bei Wildtyppflanzen waren die älteren Blütenknospen gegeneinander geneigt, so dass das SAM im Zentrum der Infloreszenz nicht sichtbar war. Die auseinanderstrebende Form der leicht vergrößerten *ahp6*-Infloreszenzen ermöglichte dagegen den Blick auf das Meristem. Das Gleiche traf auf die *ckx3 ckx5* Infloreszenzen zu. Die stark vergrößerten Infloreszenzen der *ckx3 ckx5 ahp6* Dreifachmutanten waren dagegen so dicht mit Knospen besetzt, dass das SAM nicht sichtbar war.

Um zu erfahren, ob der Infloreszenzphänotyp auf eine veränderte SAM-Aktivität zurückgeht, wurden am Rasterelektronenmikroskop Aufnahmen von Infloreszenzmeristemen gemacht (Abbildung 7B). Als Vergleichswert für die Aktivität der Meristeme wurde die Anzahl der Primordien bestimmt. Als Startpunkt beim Zählen wurde das erste Primordium gewählt, dass mit einer gerade erkennbaren Linie vom Meristem abgetrennt ist (nach Smyth *et al.* 1990 erstes Primordium in Stadium 2). Es wurde dann der Entwicklung folgend bis zu dem Primordium weitergezählt, an dem sich die Kelchblätter mit deutlichen Furchen vom Blütenmeristem absetzten (erstes Primordium Stadium 4). Bis auf die *ckx5* Mutante zeigten alle untersuchten Pflanzenlinien eine deutlich Tendenz, mehr Primordien zu bilden als der Wildtyp (Abbildung 7C: Wildtyp  $5,8 \pm 0,8$  Primordien, übrige Linien 6,6 – 11 Primordien). Die Dreifachmutante bildet mit  $11 \pm 0,6$  Primordien mit Abstand die meisten Blüten. Das SAM war sichtbar vergrößert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *AHP6* die Cytokininsignaltransduktion im SAM negativ reguliert und dadurch die Meristemgröße und –aktivität mitbestimmt.



**Abbildung 7** Infloreszenzen und Infloreszenzmeristeme der *ckx3 ckx5 ahp6* Arabidopsismutanten.

(A) Aufsicht auf die Infloreszenz. *ckx3 ckx5 ahp6* Infloreszenzen bilden deutlich mehr Knospen als die des Wildtyps.

(B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Infloreszenzmeristemen. Die Blütenknospen sind nummeriert vom ersten Primordium des Stadiums 2 bis zum ersten Primordium des Stadiums 4 (nach Smyth *et al.* 1990). *ckx3 ckx5 ahp6* Meristeme sind größer und aktiver als die des Wildtyps und der anderen Mutanten. Maßstab 50  $\mu$ m.

(C) Anzahl der Primordien in den Stadien 2 – 4 (nach Smyth *et al.* 1990), die auf den REM-Aufnahmen pro SAM gezählt wurden. Die quantitative Darstellung zeigt, dass die Dreifachmutante deutlich mehr Primordien bildet als der Wildtyp.  $n = 2$  (*ckx3 ckx5*) / 6 (*ckx5 ahp6*, *ckx3 ckx5 ahp6*) / 5 (alle anderen), [t-Test]: \* =  $p < 0,01$

### 3.1.3 Blütenmerkmale der *ckx3 ckx5 ahp6* Mutanten

Die Expression von *AHP6* in den Blütenmeristemen (Abbildung 6B, 1C) ließ vermuten, dass ein *ahp6* Gendefekt ebendort sichtbar werden könnte. Die *ahp6* Blüten sahen aus wie Wildtypblüten (Abbildung 8A). Die *ckx3 ckx5* Blüten waren wie erwartet (Bartrina 2006) vergrößert, die verlängerten Gynoecien ragten über die geschlossenen Blüten hinaus. Die Blüten der Dreifachmutanten sahen ähnlich aus, waren aber nicht ganz so stark vergrößert wie die *ckx3 ckx5* Blüten. Außerdem fielen die an den Rändern deformierten Kelchblätter auf, die so verkürzt waren, dass die verlängerten Griffel sehr weit aus den geschlossenen Blüten herausragten. Die Störung der Blütenentwicklung war schon in sehr frühen Stadien sichtbar (Abbildung 8B). Bei Wildtyppflanzen beginnen nach der Entstehung der Kelchblattprimordien (Stadium 3, nach Smyth *et al.* 1990) die Kelchblätter, über das Blütenmeristem zu wachsen, bis sie es schließlich komplett umschließen (Stadien 4 – 6). Die Primordien der Staub- und Blütenblätter sind nur kurz sichtbar, in Stadium 5. Bei den *ckx3 ckx5 ahp6* Pflanzen waren diese jedoch auch noch zu Beginn von Stadium 7 zwischen den nicht geschlossenen Kelchblättern sichtbar.

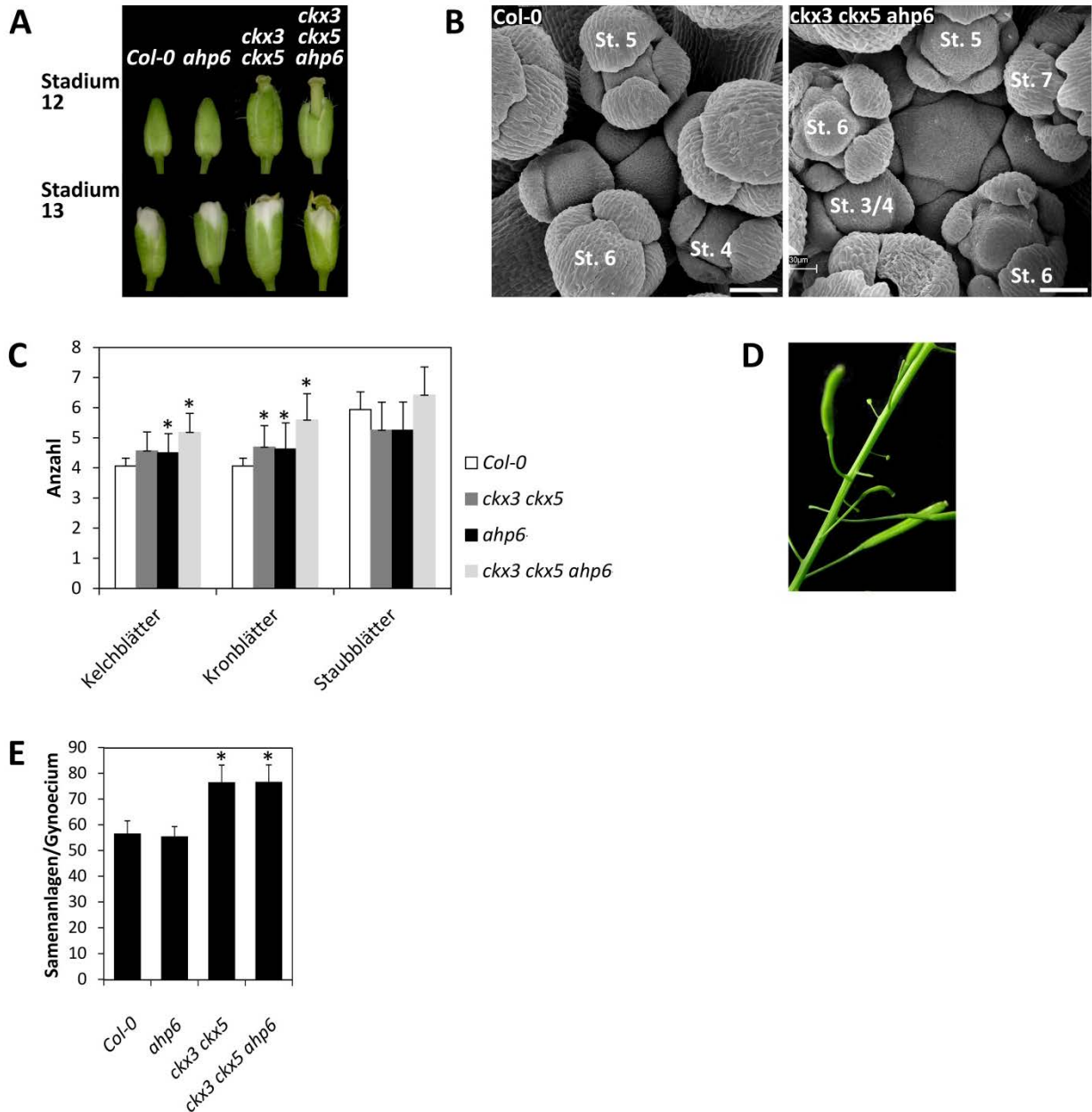
Als nächstes wurde die Produktivität der Gynoecien untersucht (Abbildung 8E). Es zeigte sich, dass sich die *ahp6* Mutante mit  $55,6 \pm 3,8$  Samenanlagen pro Gynoecium (SA/Gyn) nicht vom Wildtyp ( $56,8 \pm 4,9$  SA/Gyn) unterschied. Die *ckx3 ckx5* Mutante war mit  $76,7 \pm 6,7$  SA/Gyn deutlich produktiver, so wie auch die Dreifachmutante mit  $76,8 \pm 6,5$  SA/Gyn. Ein additiver oder synergistischer Effekt der *ckx* und *ahp6* Mutationen wurde nicht beobachtet.

Weiterhin wurden die Blütenorgane gezählt (Abbildung 8C). Die *ckx* und *ahp6* Mutanten offenbarten eine deutliche Tendenz, mehr Blütenorgane zu bilden. Der normale Blütenaufbau bei *Arabidopsis* sieht 4 Kelch- und 4 Kronblätter, 6 Antheren und einen Griffel mit zwei verwachsenen Fruchtblättern (Karpellen) vor (Blütenformel  $K_4 C_4 A_6 G(2)$ ). Die Dreifachmutante bildete jedoch  $5,2 \pm 0,6$  Kelchblätter,  $5,6 \pm 0,9$  Kronblätter und  $6,4 \pm 0,9$  Staubblätter aus. Die Zahl der Fruchtblätter wurde nicht quantitativ erfasst, es wurden jedoch häufig mehr als zwei Karpelle beobachtet.

Die Ergebnisse legen nahe, dass *AHP6* die Aktivität der Plazenta in den Karpellen nicht beeinflusst, wohl aber die Aktivität des Blütenmeristems selbst.

An älteren Sprossen mancher Tripelmutanten fielen vermehrt kleine Blütenstiele auf, die weder Blüten noch Schoten trugen (bis zu 21 Stück an einer Pflanze, Abbildung 8D). Es ist nicht bekannt, wie diese Strukturen entstehen.





**Abbildung 8** Blütenphänotyp der *cks3 cks5 ahp6* Arabidopsismutanten.

(A) Blüten in Stadium 12 und 13 (nach Smyth *et al.* 1990). *ahp6* Blüten sehen aus wie Wildtypblüten. Die Blüten der *cks3 cks5 ahp6* Pflanzen sind größer als beim Wildtyp und ähneln denen der *cks* Doppelmutante.

(B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Infloreszenzmeristemen und Blüten. Stadien (St.) sind nach Smyth *et al.* (1990) bezeichnet. Die Blüten- und Staubblattprimordien von *cks3 cks5 ahp6* Mutanten sind noch in Stadium 7 sichtbar. Bei Wildtyppflanzen ist ab Stadium 6 das Innere der Blüte komplett verschlossen.

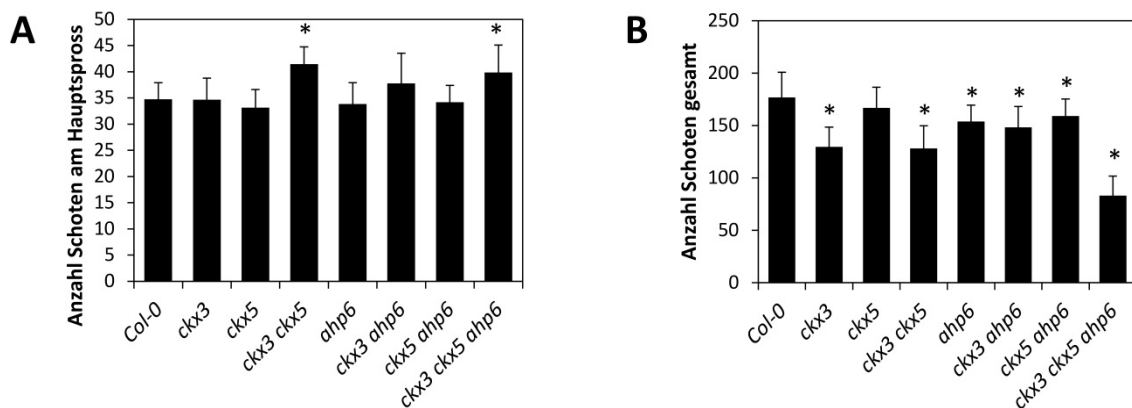
(C) Anzahl der Blütenorgane. *cks3 cks5 ahp6* Mutanten bilden mehr Kelch- und Kronblätter als die Kontrollpflanzen. n = 16, [t-Test]: \* = p < 0,01

(D) Nicht entwickelte Schoten an der *cks3 cks5 ahp6* Dreifachmutante.

(E) Anzahl der Samenanlagen in den Gynoecien (gezählt im Blütenstadium 15, Smyth *et al.* 1990). *cks3 cks5* und *cks3 cks5 ahp6* Pflanzen bilden gleichviele Samenanlagen pro Gynoecium. n = 18, [t-Test]: \* = p < 0,01. Diese Untersuchung wurde nur an Pflanzen mit einem *ahp6-3* Allel durchgeführt.

### 3.1.4 Schotenansatz der *ckx3 cks5 ahp6* Mutanten

Die elektronenmikroskopischen Bilder hatten gezeigt, dass die Infloreszenzmeristeme der *ckx ahp6* Mutanten mehr Primordien produzieren als die der Wildtyppflanzen. Als nächstes wurde daher geprüft, ob diese erhöhte Meristemaktivität auch anhand der Schotenentwicklung nachvollziehbar ist. Dafür wurden am Ende des Lebenszyklus die Schoten der *ckx3 cks5 ahp6* Mutanten und der entsprechenden Kontrollpflanzen gezählt, wobei zwischen den Schoten nur am Hauptspross und der Gesamtschotenanzahl unterschieden wurde.



**Abbildung 9** Schotenansatz der *ckx3 cks5 ahp6* Arabidopsismutanten.

(A) Anzahl der Schoten am Hauptspross. Die Hauptsprosse sowohl der *ckx3 cks5* als auch der *ckx3 cks5 ahp6* Mutanten tragen mehr Schoten als die Wildtyppflanzen.

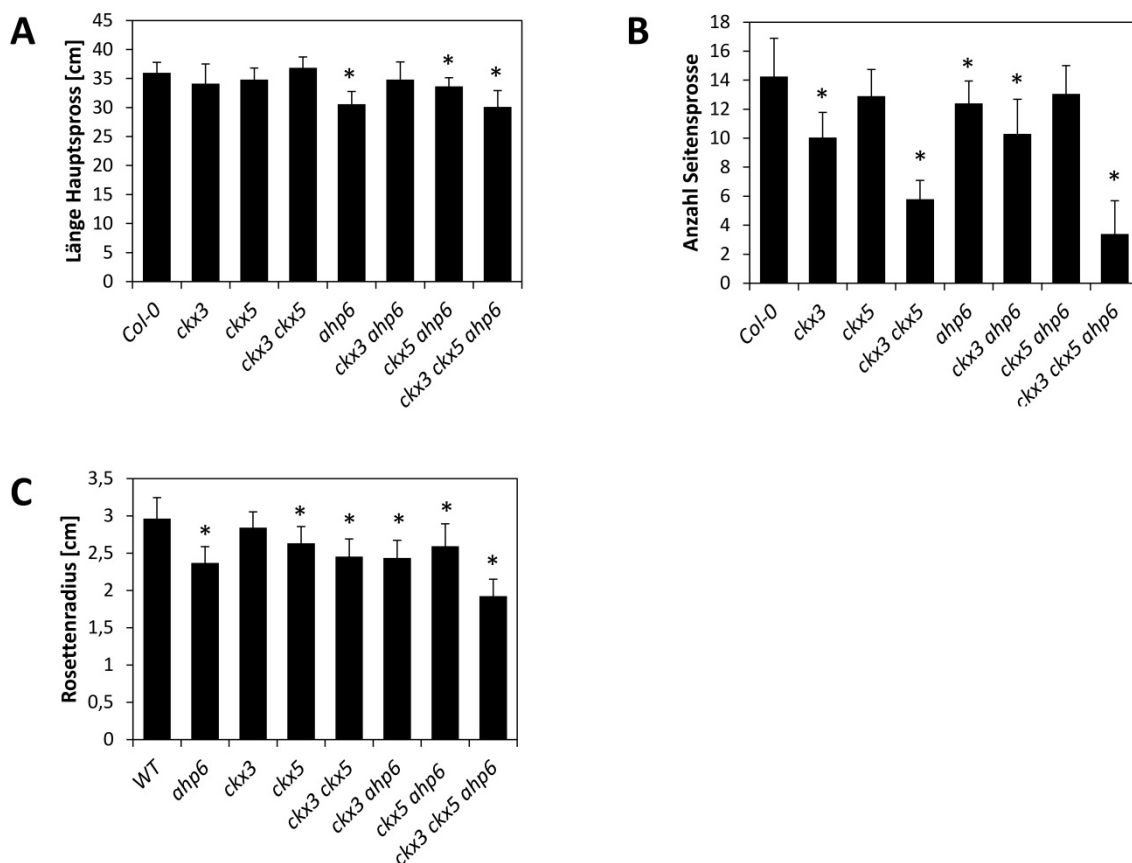
(B) Gesamtschotenanzahl. Alle Mutanten setzen insgesamt weniger Schoten an als der Wildtyp, wobei die *ckx3 cks5 ahp6* Mutante am wenigsten Schoten bildet.

Die Zählung der Schoten wurde an abreifenden Pflanzen durchgeführt. n = 20, [t-Test]: \* = p < 0,01

Die Zählung der Schoten am Hauptspross (Abbildung 9A) und an der Gesamtpflanze (Abbildung 9B) ergaben gegensätzliche Resultate. Obwohl die *ckx3 cks5* und die *ckx3 cks5 ahp6* Mutanten mit  $41,5 \pm 3,3$  und  $39,9 \pm 5,2$  Schoten am Hauptspross produktiver waren als alle anderen untersuchten Pflanzen (33,2 – 37,8 Schoten, je nach Genotyp), entwickelten beide als Gesamtpflanze weniger Schoten ( $128,1 \pm 21,7$  und  $83,1 \pm 18,7$  Schoten versus  $176,9 \pm 23,9$  Schoten beim Wildtyp). Die anderen Mutanten unterschieden sich in Bezug auf den Hauptspross kaum vom Wildtyp, bildeten aber in Bezug auf die gesamte Pflanze weniger Schoten (129,6 – 166,8 Schoten, je nach Genotyp). Diese Beobachtung lässt sich auf die geringere Anzahl von Seitensprossen zurückführen (Abbildung 10B).

### 3.1.5 Untersuchung vegetativer Merkmale von *ckx3 cks5 ahp6* Mutanten

Da ein veränderter Cytokininstatus im Sprossapex nicht nur im SAM, sondern in der ganzen Pflanze sichtbar ist, wurden neben den Meristemen, Blüten und Schoten auch Spross- und Rosettenmerkmale untersucht.



**Abbildung 10** Untersuchung des vegetativen Phänotyps von *ckx3 ckx5 ahp6* Arabidopsismutanten. (A) Länge des Hauptsprosses. Das Sprosswachstum ist bei den *ahp6*, *ckx5 ahp6* und *ckx3 ckx5 ahp6* Mutanten leicht reduziert. (B) Anzahl der Seitensprosse. Die Anzahl der Seitensprosse ist in allen Mutanten geringer als beim Wildtyp. Die stärkste Reduktion zeigt die *ckx3 ckx5 ahp6* Dreifachmutante. (C) Messung des Rosettenradius. Der Rosettenradius ist bei allen Mutanten kleiner als beim Wildtyp. Die *ckx3 ckx5 ahp6* Mutante zeigt dabei mit Abstand die stärkste Abweichung. Die Sprossparameter wurden an abreifenden Pflanzen erhoben. Der Rosettendurchmesser wurde gemessen, als die Pflanzen mit der Elongation des Infloreszenzspores begannen. n = 20, [t-Test]: \* = p < 0,01

Drei der Mutanten (*ahp6*, *ckx5 ahp6*, *ckx3 ckx5 ahp6*) bildeten mit 30,1 – 33,7 cm einen kürzeren Hauptspross als der Wildtyp mit  $36 \pm 1,8$  cm (Abbildung 10A). Die Untersuchung der Verzweigungen ergab größere Unterschiede. Fünf der Mutanten (*ckx3*, *ckx3 ckx5*, *ahp6*, *ckx3 ahp6*, *ckx3 ckx5 ahp6*) bildeten mit 3,4 – 12,4 Verzweigungen pro Pflanze signifikant weniger Seitensprosse als der Wildtyp ( $14,3 \pm 2,6$  Seitensprosse), wobei die *ckx3 ckx5 ahp6* Dreifachmutante mit  $3,4 \pm 2,3$  Seitensprossen mit Abstand den stärksten Phänotyp ausbildete

Die Messung des Rosettenradius (Abbildung 10C) zeigte, dass die verschiedenen Mutanten kleinere Rosetten (1,9 – 2,8 cm) entwickelten als der Wildtyp ( $3 \pm 0,3$  cm). Aufgrund der ähnlichen Werte war es schwierig, Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutanten zu erkennen. Ausnahme war die *ckx3 ckx5 ahp6* Mutante, die mit  $1,9 \pm 0,2$  cm Radius mit Abstand die kleinste Pflanze war. Die nächstgrößere *ahp6* Mutante lag mit  $2,4 \pm 0,2$  cm deutlich darüber.

Domänenspezifische Veränderung des Cytokininstatus im Sprossmeristem von *Arabidopsis thaliana*

Die Untersuchung der *ckx3*, *ckx5* und *aph6* Mutanten hatte gezeigt, dass eine lokale Erhöhung des Cytokininstatus in verschiedenen SAM Bereichen verstärkend auf die Aktivität des Meristems wirkt. Das nächste Ziel war daher, die Relevanz des Cytokininstatus in unterschiedlichen Bereichen des SAM näher zu untersuchen, wobei das Hauptaugenmerk auf dem Meristemzentrum mit den Stammzellen und dem OZ lag.

Um den Cytokininstatus im SAM kleinräumig zu verändern, wurden neun unterschiedliche Promotor-Gen-Konstrukte erstellt (s. Abschnitt 2.3.5.4) und stabil in *Arabidopsis* transformiert. Die verwendeten Promotoren waren *pWUS* (Groß-Hardt *et al.* 2002; Leibfried *et al.* 2005), der im organisatorischen Zentrum aktiv ist, der Stammzellen-spezifische *CLV3* Promotor (Brand *et al.* 2002, Abb. Einleitung) und der Promotor von *CLV1* (Schoof *et al.* 2000), der in einem größeren Bereich des SAM-Zentrums aktiv ist. Eine grafische Darstellung der Expressionsdomänen dieser drei meristemspezifischen Gene befindet sich in der Einleitung (Abbildung 4D - F). Die Promotoren wurden entweder mit dem *CKX1* Gen kombiniert (Werner *et al.* 2001) oder mit *ROCK2* (Braun, unveröffentlicht, Doktorarbeit), das für eine konstitutiv aktive Form des AHK2-Rezeptors kodiert, oder mit *ARR1-SRDX*, dem Gen für einem künstlichen Suppressor der Cytokininsignaltransduktion (Heyl *et al.* 2008). Die drei Gene sollten in den anvisierten SAM-Bereichen den Cytokininstatus auf unterschiedliche Weise verändern. Bei *ROCK2*-exprimierenden Pflanzen sollte in den jeweiligen Zieldomänen ein konstitutives Cytokininsignal übertragen werden, unabhängig davon, ob und wie viel Cytokinin in den entsprechenden Zellen vorhanden ist. Pflanzen, die ein Konstrukt mit dem *CKX1* Gen trugen, sollten in den Zielbereichen über weniger Cytokinin verfügen, während die Konstrukte mit dem *ARR1-SRDX* Gen eine Repression der Cytokininsignaltransduktion bewirken sollten.

Alle erzeugten transgenen Pflanzen wurden zunächst oberflächlich untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die *pCLV3:ROCK2* transgenen Pflanzen für weiterführende Untersuchungen ausgewählt

### **3.2 Domänenspezifische Veränderung des Cytokininstatus im Sprossmeristem von *Arabidopsis thaliana***

Die Untersuchung der *ckx3*, *ckx5* und *aph6* Mutanten hatte gezeigt, dass eine lokale Erhöhung des Cytokininstatus in verschiedenen SAM Bereichen verstärkend auf die Aktivität des Meristems wirkt. Das nächste Ziel war daher, die Relevanz des Cytokininstatus in unterschiedlichen Bereichen des SAM näher zu untersuchen, wobei das Hauptaugenmerk auf dem Meristemzentrum mit den Stammzellen und dem OZ lag.

Um den Cytokininstatus im SAM kleinräumig zu verändern, wurden neun unterschiedliche Promotor-Gen-Konstrukte erstellt (s. Abschnitt 2.3.5.4) und stabil in *Arabidopsis* transformiert. Die verwendeten Promotoren waren *pWUS* (Groß-Hardt *et al.* 2002; Leibfried *et al.* 2005), der im organisatorischen

Zentrum aktiv ist, der Stammzellen-spezifische *CLV3* Promotor (Brand *et al.* 2002, Abb. Einleitung) und der Promotor von *CLV1* (Schoof *et al.* 2000), der in einem größeren Bereich des SAM-Zentrums aktiv ist. Eine grafische Darstellung der Expressionsdomänen dieser drei meristemspezifischen Gene befindet sich in der Einleitung (Abbildung 4D - F). Die Promotoren wurden entweder mit dem *CKX1* Gen kombiniert (Werner *et al.* 2001) oder mit *ROCK2* (Braun, unveröffentlicht, Doktorarbeit), das für eine konstitutiv aktive Form des AHK2-Rezeptors kodiert oder mit *ARR1-SRDX*, dem Gen für einem künstlichen Suppressor der Cytokininsignaltransduktion (Heyl *et al.* 2008). Die drei Gene sollten in den anvisierten SAM-Bereichen den Cytokininstatus auf unterschiedliche Weise verändern. Bei *ROCK2*-exprimierenden Pflanzen sollte in der jeweiligen Zieldomäne ein konstitutives Cytokininsignal übertragen werden, unabhängig davon, ob und wie viel Cytokinin in den entsprechenden Zellen vorhanden ist. Pflanzen, die ein Konstrukt mit dem *CKX1* Gen trugen, sollten in den Zielbereichen über weniger Cytokinin verfügen, während die Konstrukte mit dem *ARR1-SRDX* Gen eine Repression der Cytokininsignaltransduktion bewirken sollten.

Alle erzeugten transgenen Pflanzen wurden zunächst oberflächlich untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die *pCLV3:ROCK2* transgenen Pflanzen für weiterführende Untersuchungen ausgewählt.

### 3.2.1 Phänotypische Beschreibung der transgenen Linien

Nach der Transformation mit den oben beschriebenen Konstrukten wurden pro Transgen 22 – 35 Primärtransformanten (= T<sub>1</sub>-Pflanzen) untersucht. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Anzahl der erstellten Primärtransformanten und die dazugehörigen Phänotypen. Vier der verwendeten Konstrukte verursachten keinen offensichtlichen Phänotyp, alle anderen Transgene bewirkten eine Veränderung des Wachstums und der Entwicklung. In den Abschnitten 3.2.1.1 bis 3.2.1.9 folgt eine ausführlichere Beschreibung der verschiedenen Pflanzengruppen.

Begleitend zur phänotypischen Untersuchung wurde auch eine Transkriptanalyse durchgeführt. Dafür wurden pro Transgen jeweils 7 Tage alte Keimlinge von drei unabhängigen Linien per RT- oder qRT-PCR auf die Transkription des Transgens hin untersucht. Um die Spezifität der PCR für das Transgen zu gewährleisten, wurden die Primer so gewählt, dass nur einer für *CKX1*, *AHK2* (= *ROCK2*) bzw. *ARR1* passend war, während der zweite Primer in der das Transgen flankierenden *att*-Sequenz bzw. in der *SRDX*-Sequenz band. Die Pflanzen, die ein *ROCK2* Gen trugen, wurden per qRT-PCR auf dessen Transkription getestet. Als Bezugsprobe (relative *ROCK2*-Transkriptmenge = 1) wurde dabei nicht der Wildtyp gewählt, da dieser das Transgen nicht exprimiert. Stattdessen wurde die im Vergleich zu allen *ROCK2* qRT-PCR-Proben am schwächsten exprimierende transgene Linie *pWUS:ROCK2 #5* als Bezugsprobe verwendet.

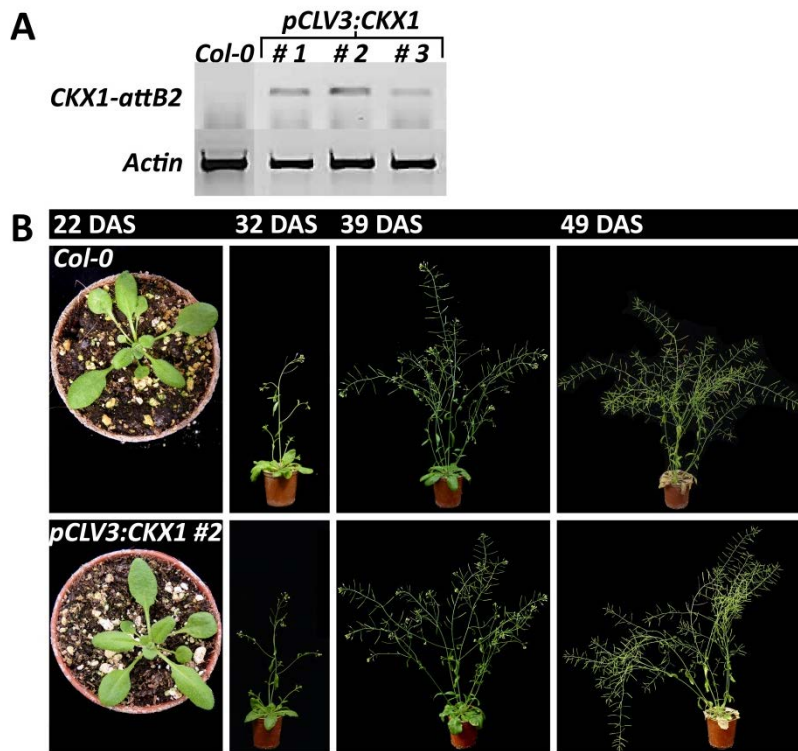
**Tabelle 11** Domänenspezifische Änderung des Cytokininstatus im SAM von Arabidopsis. Liste der erstellten Konstrukte und die entsprechenden Phänotypen der transgenen Pflanzen, sowie die Anzahl der fertilen Primärtransformanten (= T<sub>1</sub>-Pflanzen).

Konstruktname	Anzahl T <sub>1</sub> -Linien	Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp
<i>pCLV3:CKX1</i>	22	Wie Wildtyp
<i>pCLV3:ARR1-SRDX</i>	29	Wie Wildtyp
<i>pCLV3:ROCK2</i>	32	Wenige Rosettenblätter, frühe Elongation der Infloreszenz, Akkumulation von Blütenknospen vor dem Öffnen der Blüten, Spross kaum verzweigt, unbegrenztes Wachstum des Hauptsprosses, vergrößertes SAM
<i>pWUS:CKX1</i>	30	Wie Wildtyp
<i>pWUS:ARR1-SRDX</i>	32	Wie Wildtyp
<i>pWUS:ROCK2</i>	24	Viele T <sub>1</sub> -Pflanzen mit kugelförmig verdicktem SAM oder ohne SAM, steril (nicht in die Anzahl der untersuchten T <sub>1</sub> -Linien eingerechnet). Pflanzen mit schwächerem Phänotyp bilden verdickten, nadelförmigen Spross, z.T. ohne Blüten. Normal blühende Sprosse entstehen aus Seitentrieben. Verlust dieses Phänotyps in der T <sub>2</sub> -Generation.
<i>pCLV1:CKX1</i>	35	Pflanzen kleinwüchsig
<i>pCVL1:ARR1-SRDX</i>	22	Buschige Rosetten, verspätete Elongation der Infloreszenz, verringerte Apikaldominanz, verlängerte Lebensdauer
<i>pCLV1:ROCK2</i>	24	Keimlinge mit länglichen Kotyledonen und spitzen Blättchen, Blätter später eingerollt und verdreht, abnormales Sprosswachstum, z.T. verdickter Spross

### 3.2.1.1 Die Entwicklung der *pCLV3:CKX1* transgenen Pflanzen

Die 22 Primärtransformanten mit *pCLV3:CKX1*-Konstrukt waren den Kontrollpflanzen ähnlich und zeigten auch in der Folgegeneration keine offensichtliche Veränderung des Phänotyps (Abbildung 11B). Die mRNA des Transgens wurde in Keimlingen von drei unabhängigen Linien per RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 11A).

Ein verstärkter Cytokininabbau in den Stammzellen ist also für das Wachstum der Pflanze nicht von Bedeutung.

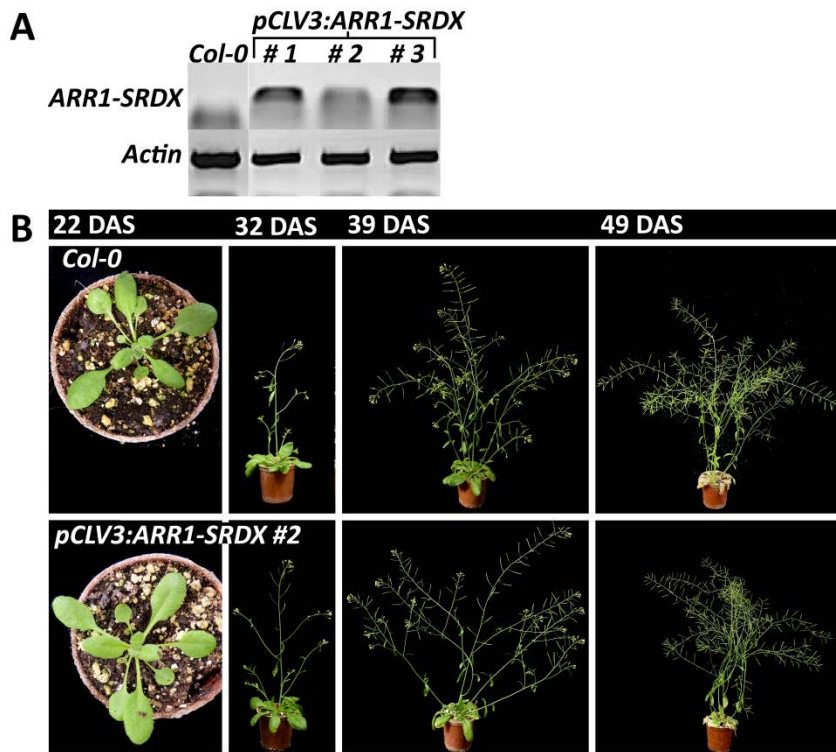


**Abbildung 11** Nachweis der Transgen-mRNA und Phänotyp der *pCLV3:CKX1* transgenen Pflanzen. (A) mRNA von transgenem *CKX1* wurde in Keimlingen von drei unabhängigen T<sub>2</sub>-Linien nachgewiesen. Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR, 25 PCR-Zyklen. (B) Vergleich von Wildtyp- und transgenen Pflanzen während verschiedener Entwicklungsstadien. Die Transkription des *pCLV3:CKX1* Transgens bewirkt keine Veränderung des Phänotyps.

### 3.2.1.2 Die Entwicklung der *pCLV3:ARR1-SRDX* transgenen Pflanzen

In den 29 Individuen der *pCLV3:ARR1-SRDX* T<sub>1</sub>-Generation konnte im Vergleich zum Wildtyp keine einheitliche und deutliche Veränderung des Phänotyps beobachtet werden. Auch in der T<sub>2</sub>-Generation wurde in mehreren unabhängigen Linien keine Veränderung beobachtet (Abbildung 12B). Die Transkription des Transgens wurde exemplarisch in drei unabhängigen T<sub>2</sub>-Linien nachgewiesen (Abbildung 12A).

Die Expression des Signalingsuppressors *ARR1-SRDX* unter dem Stammzellen-spezifischen *pCLV3* Promotor hat also keine direkt sichtbaren Auswirkungen auf die Entwicklung der Pflanze.



**Abbildung 12** Nachweis der Transgen-mRNA und Phänotyp der *pCLV3:ARR1-SRDX* transgenen Pflanzen.

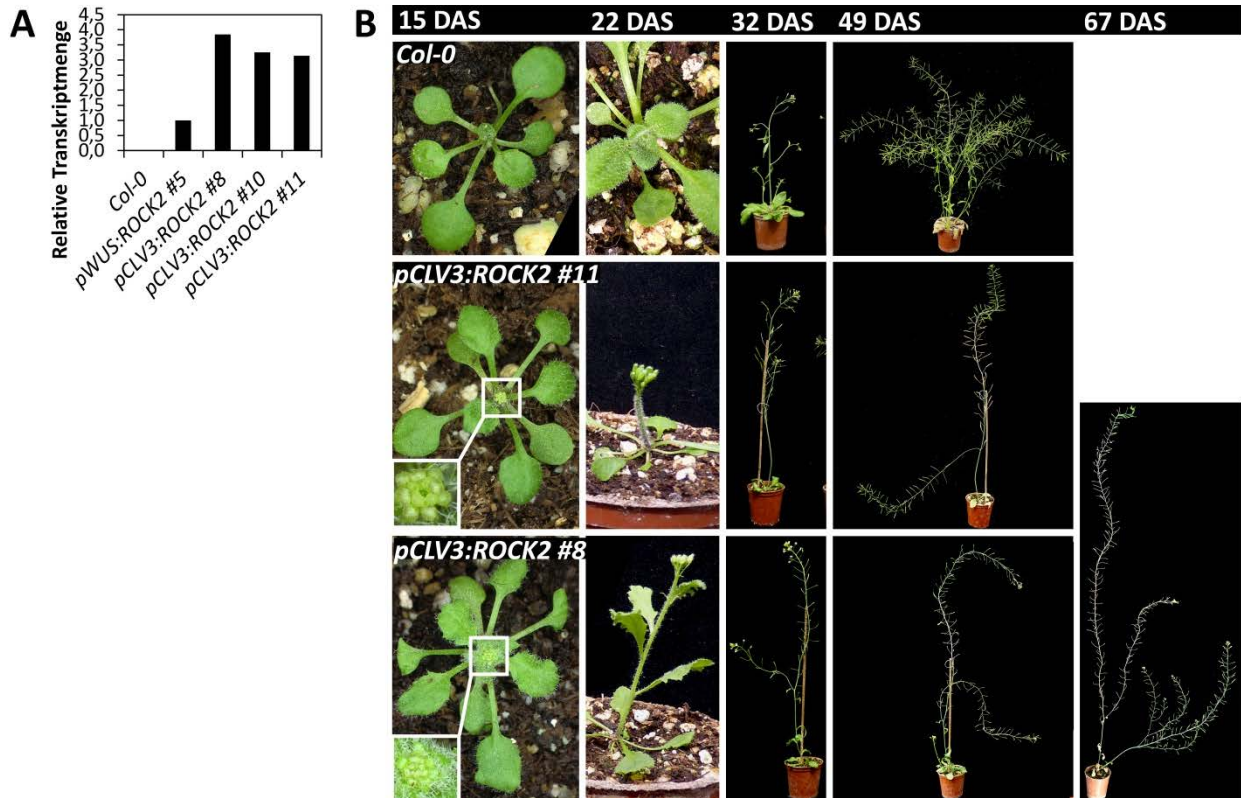
(A) *ARR1-SRDX* mRNA wurde in Keimlingen von drei unabhängigen T<sub>2</sub>-Linien nachgewiesen. Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR, 30 PCR-Zyklen.

(B) Vergleich von Wildtyp- und transgenen Pflanzen während verschiedener Entwicklungsstadien. Die Transkription des *pCLV3:ARR1-SRDX* Transgens bewirkt keine Veränderung des Phänotyps.



### 3.2.1.3 Die Entwicklung der *pCLV3:ROCK2* transgenen Pflanzen

Nach der Transformation mit dem *pCLV3:ROCK2*-Konstrukt wurden 27 Primärtransformanten selektiert. Diese zeigten einen veränderten, uniformen Phänotyp. Die Pflanzen bildeten einen verdickten, nahezu unverzweigten und blattlosen Infloreszenzpross, an dessen Apex eine große Zahl von Blütenknospen scheibenförmig akkumuliert wurde, bevor diese sich schließlich öffneten. Die Blüten waren vergrößert und die Phyllotaxis gestört.



**Abbildung 13** Nachweis der Transgen-mRNA und Phänotyp der *pCLV3:ROCK2* transgenen Pflanzen. (A) *ROCK2* mRNA wurde in drei unabhängigen, homozygoten T<sub>4</sub>-Linien nachgewiesen. Analyse mittels qRT-PCR.

(B - D) Vergleich von Wildtyppflanzen (B) und zwei unabhängigen transgenen Linien (C, D) während verschiedener Entwicklungsstadien. *pCLV3:ROCK2* Pflanzen bilden und akkumulieren schon nach zwei Wochen Blütenknospen und beginnen früher mit der Elongation des Hauptsprosses als der Wildtyp. Der Spross der transgenen Pflanzen ist kaum verzweigt, wird aber mehr als doppelt so lang wie der des Wildtyps.

In der Folgegeneration wurden 14 unabhängige Linien untersucht. Von diesen zeigten 11 den T<sub>1</sub>-Phänotyp, drei waren dem Wildtyp ähnlich.

Stellvertretend für alle transgenen Linien wurden Keimlinge von drei homozygoten T<sub>4</sub>-Linien per qRT-PCR untersucht. In allen drei Linien konnte die Transkription von *ROCK2* nachgewiesen werden (Abbildung 13A).

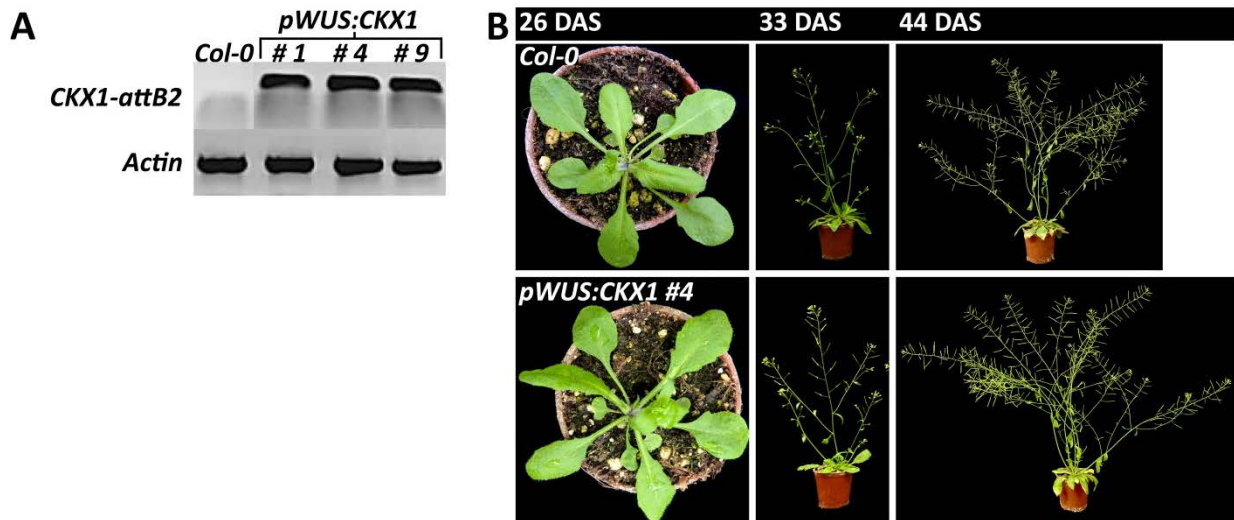
Für die phänotypische Charakterisierung wurden zwei Linien, #8 und #11, ausgewählt (Abbildung 13C, D). Diese zeigten in den homozygoten T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Generationen einen zur T<sub>1</sub>-Generation

unveränderten Phänotyp. Während bei 15 Tage alten Col-0 Pflanzen noch keine Blütenknospen erkennbar waren (Abbildung 13B), waren diese im Rosettenzentrum der #8- und #11-Pflanzen bereits sichtbar (Abbildung 13C, D). Bei manchen Pflanzen war zwischen den Knospen mit bloßem Auge das SAM als dunkelgrüner Punkt erkennbar. 22 DAS hatten beide transgenen Linien mit der Elongation des Sprosses begonnen, wobei sämtliche Knospen geschlossen blieben und scheibenartig dicht aneinander gepackt waren. Die Sprosse der #11-Pflanzen waren weitgehend blattlos und vergleichsweise dick, während die #8-Pflanzen einige gezähnte Blätter am Infloreszenzsporn entwickelten. Der Wildtyp hatte zum gleichen Zeitpunkt Knospen gebildet aber noch nicht mit dem Wachstum der Infloreszenz begonnen. 32 DAS blühten sowohl die Kontrollen als auch die transgenen Pflanzen. Die Sprosse der transgenen Pflanzen waren ca. doppelt so lang wie die Kontrollen und weniger verzweigt. Die Seitensprosse der transgenen Pflanzen zeigten eine reduzierte Ausprägung des Hauptsprossphänotyps. So akkumulierten sie keine geschlossenen Knospen und das SAM war nicht mit bloßem Auge sichtbar. 49 DAS hatten die Col-0 Pflanzen ihren Lebenszyklus nahezu abgeschlossen. Die maximal einfach verzweigten Hauptsprosse der beiden transgenen Linien wuchsen dagegen weiter, obwohl die Schoten am unteren Sprossteil bereits seneszierten. Die Pflanzen der Linie #11 waren nach 67 Tagen abgestorben, die der Linie #8 wuchsen dagegen immer noch weiter. Das Ende des Hauptsprosses war kallusartig verdickt, die Seitentriebe entwickelten sich jedoch weiterhin normal.

### 3.2.1.4 Die Entwicklung der *pWUS:CKX1* transgenen Pflanzen

Es wurden 30 Primärtransformanten mit *pWUS:CKX1* Transgen untersucht, wobei keine phänotypische Veränderung festgestellt wurde. Die mRNA des Transgens wurde in drei unabhängigen T<sub>2</sub>-Linien nachgewiesen (Abbildung 14A). Auch in dieser Generation war keine Veränderung des Phänotyps zu beobachten (Abbildung 14B).

Die Verringerung des Cytokiningehalts zeigt also auch im organisatorischen Zentrum keinen Effekt.

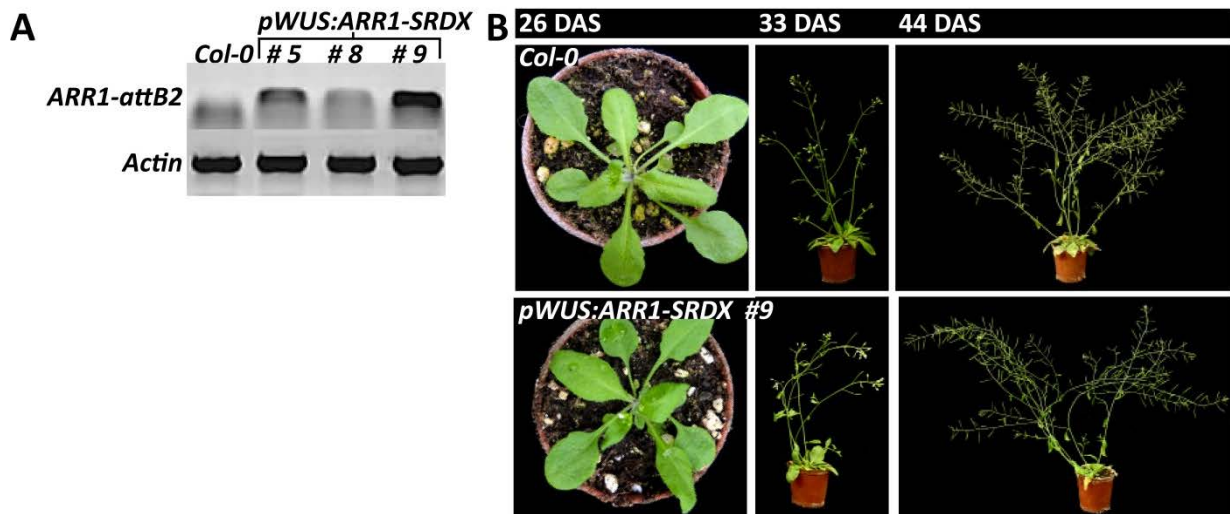


**Abbildung 14** Nachweis der Transgen-mRNA und Phänotyp der *pWUS:CKX1* transgenen Pflanzen. (A) mRNA von transgenem *CKX1* wurde in Keimlingen von drei unabhängigen T<sub>2</sub>-Linien nachgewiesen. Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR, 30 PCR-Zyklen. (B) Vergleich von Wildtyp- und transgenen Pflanzen während verschiedener Entwicklungsstadien. Die Transkription des *pWUS:CKX1* Transgens bewirkt keine Veränderung des Phänotyps.

### 3.2.1.5 Die Entwicklung der *pWUS:ARR1-SRDX* transgenen Pflanzen

Von den 32 untersuchten T<sub>1</sub>-Pflanzen mit *pWUS:ARR1-SRDX*-Konstrukt zeigte keine einen auffällig veränderten Phänotyp. In Pflanzen der T<sub>2</sub>-Generation wurde für drei unabhängigen Linien die Transkription des Transgens nachgewiesen (Abbildung 15A). Der Phänotyp war auch in dieser Generation nicht verändert (Abbildung 15B).

Auch im OZ bewirkt also die Unterdrückung der Cytokininsignaltransduktion keine Veränderung des Pflanzenwachstums.



**Abbildung 15** Nachweis der Transgen-mRNA und Phänotyp der *pWUS:ARR1-SRDX* transgenen Pflanzen.

(A) *ARR1-SRDX* mRNA wurde in Keimlingen von drei unabhängigen T<sub>2</sub>-Linien nachgewiesen. Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR, 30 PCR-Zyklen.

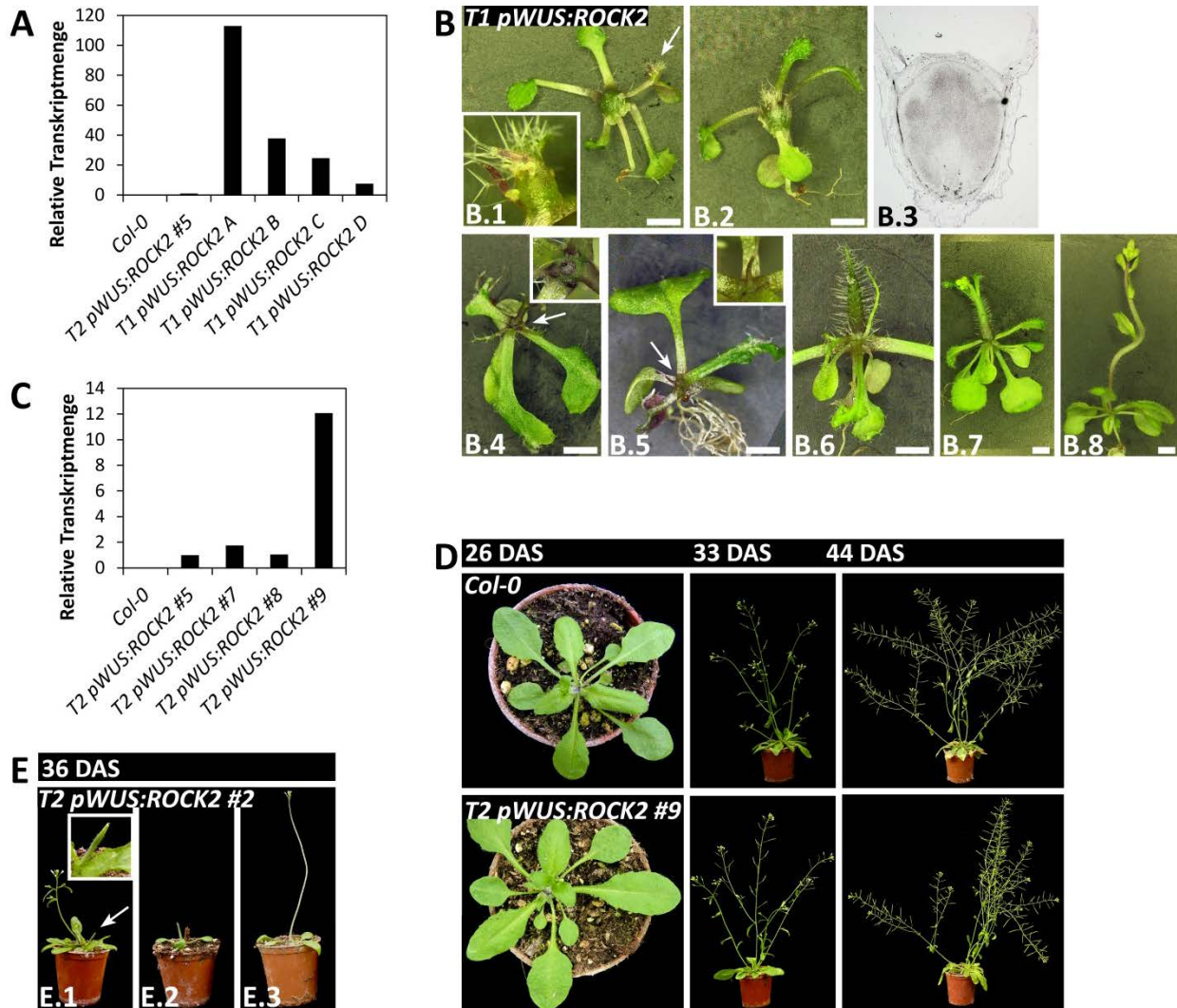
(B) Vergleich von Wildtyp- und transgenen Pflanzen während verschiedener Entwicklungsstadien. Die Transkription des *pWUS:ARR1-SRDX* Transgens bewirkt keine Veränderung des Phänotyps.

### 3.2.1.6 Die Entwicklung der *pWUS:ROCK2* transgenen Pflanzen

In mehreren Selektionsdurchläufen wurden über 100 Primärtransformanten mit *pWUS:ROCK2* Transgen untersucht. Dabei wurden verschiedene Phänotypen registriert (Häufigkeit nicht quantifiziert). Pflanzen vom Typ A (Abbildung 16B.1 – B.3) wurden nicht größer als zwei Wochen alte Wildtypkeimlinge und entwickelten einen knollenförmig verdickten Spross, der mit Trichomen besetzt war. Anatomische Schnitte zeigten, dass die knolligen Sprosse hauptsächlich aus undifferenzierten Zellen bestanden, die von einer dünnen Schicht aus Xylemgefäßen und Zellen unbekannter Identität (aufgrund der Lage wahrscheinlich Kortexzellen) umgeben waren (Abbildung 16B.3). Teilweise bildeten sich auch an den Blattstielen solche trichombesetzten Knollen (Abbildung 16B.1). Eine zweite Gruppe von Pflanzen (Typ B, Abbildung 16B.4, B.5) stellte die Aktivität des Sprossmeristems nach der Bildung weniger, teilweise filiformer oder gegabelter Blätter ein. Der Sprossapex war entweder als flache leere Fläche zwischen den Blättern erkennbar (Abbildung 16B.4) oder das SAM brauchte sich mit der Bildung eines zentralen radiärsymmetrischen Organs auf (Abbildung 16B.5). Die Keimlinge von Typ A und B entwickelten sich nicht weiter. Wurden sie auf den Selektionsplatten belassen, überlebten sie für mindestens 5 Wochen, auf Erde pikiert starben sie nach kurzer Zeit.

Die Pflanzen mit Typ C Phänotyp (Abbildung 16B.6, B.7) bildeten ebenfalls einen verdickten Sprossapex, doch dieser konnte als weitgehend blattloser, verdickter Spross verlängert werden. Auf Erde war ein Teil der Pflanzen in der Lage, Blüten und Samen zu bilden. Blüten entstanden entweder an der Spitze des Sprosses (ähnlich Abbildung 16E.3) oder aus normal entwickelten Seitensprossen (ähnlich Abbildung 16E.1). Die  $T_2$ -Nachkommen wuchsen wie Wildtyppflanzen, nur die Pflanzen einer Linie (#2) zeigten weiterhin den Typ C Phänotyp der  $T_1$ -Generation (Abbildung 16E). In der  $T_3$ -Generation war der Phänotyp jedoch auch bei dieser Linie fast vollständig verschwunden, nur ca. drei von 50 Pflanzen bildeten einen nadelförmigen Hauptspross, der schnell von Seitensprossen überwachsen wurde (ähnlich Abbildung 16E.1). Als Typ D  $T_1$ -Pflanzen wurden solche bezeichnet, die sich wie Col-0 Pflanzen entwickelten (Abbildung 16B.8).

In Pflanzen aller vier  $T_1$ -Typen konnte die Transkription von *ROCK2* nachgewiesen werden (Abbildung 16A). Bezogen auf die *pWUS:ROCK2* #5 Probe (Relative Transkriptmenge = 1) wurde bei der Probe vom Typ A eine Erhöhung des Transkriptniveaus um den Faktor 113 gemessen. Die Proben der anderen Typen lagen deutlich darunter (Relative Transkriptmenge Typ B = 38, Typ C = 25, Typ D = 8). Ein direkter Vergleich dieser qRT-PCR-Werte sollte jedoch kritisch betrachtet werden. Die verwendeten Proben (vier Wochen alte Pflanzen, auf Agar mit Kanamycin angezogen) waren morphologisch stark unterschiedlich, weshalb die Proben nicht direkt miteinander vergleichbar sind (Demidenko und Penin 2012). In den  $T_2$ -Pflanzen ohne Phänotyp (Keimlinge, Abbildung 16D) wurde ebenfalls *ROCK2*-Aktivität nachgewiesen (Abbildung 16C). Die Relative Transkriptmenge war mit Werten zwischen 1 und 12 ähnlich wie bei den  $T_1$ -Pflanzen vom Typ D.



**Abbildung 16** Nachweis der Transgen-mRNA und Phänotyp der *pWUS:ROCK2* transgenen Pflanzen. (A, C) *ROCK2* mRNA wurde sowohl in vier Wochen alten T<sub>1</sub>-Pflanzen als auch in Keimlingen von vier unabhängigen T<sub>2</sub>-Linien nachgewiesen. Die Bezeichnungen T<sub>1</sub> *pWUS:ROCK2* A – D beziehen sich auf unterschiedliche Phänotypklassen der T<sub>1</sub>-Pflanzen (siehe Text). Analyse mittels qRT-PCR.

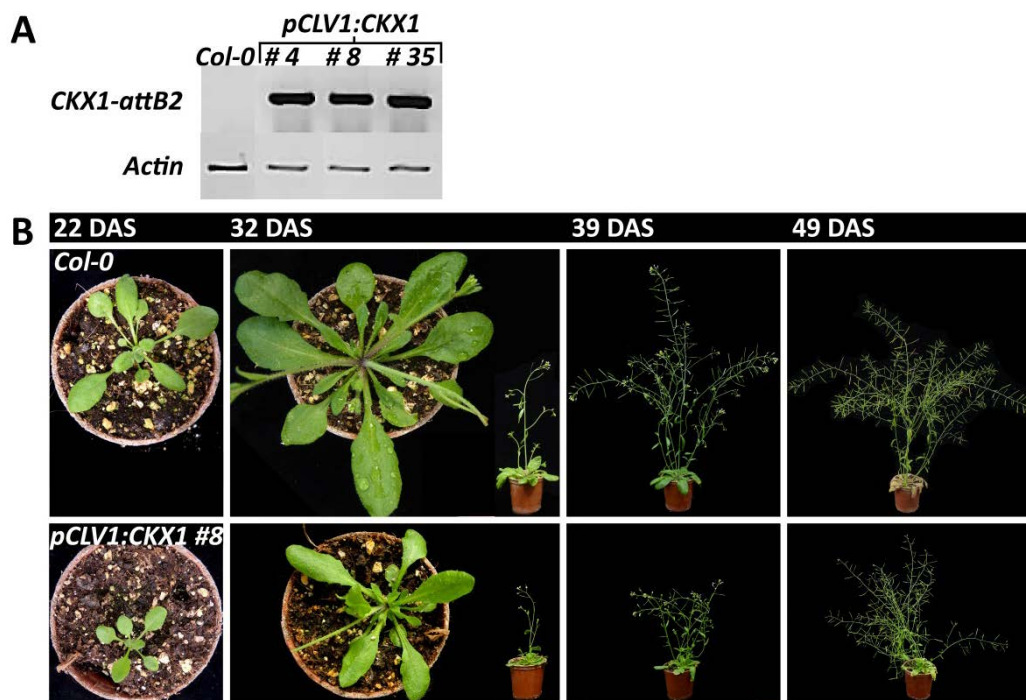
(B) Verschiedene Phänotypklassen von Primärtransformanten. (B.1, B.2) Typ A: kugelförmiges SAM, der Pfeil zeigt auf eine knollenförmige Verdickung am Blattstiel (Vergrößerung im Kasten). (B.3) Längsschnitt durch ein Typ A Meristem. (B.4, B.5) Typ B: kein SAM, die Pfeile zeigen auf das SAM-Zentrum (im Kasten vergrößert abgebildet), das entweder leer ist (B.4) oder in einem radiärsymmetrischen filiformen Organ endet (B.5). (B.6, B.7) Typ C: stark verdickter Spross, (B.8) Typ D: wie Wildtyp. Maßstab 200 µm.

(D) Vergleich von Col-0 und transgenen T<sub>2</sub>-Pflanzen während verschiedener Entwicklungsstadien. Die Transkription des *pWUS:ROCK2* Transgens (C) bewirkt keine Veränderung des Phänotyps.

(E) T<sub>2</sub>-Pflanzen der Linie #2, Typ C Phänotyp. (E.1) Ein Seitentrieb überwächst den nadelförmigen Hauptspross, der Pfeil zeigt auf den nackten Hauptspross (im Kasten vergrößert abgebildet). (E.2) nadelförmiger Hauptspross, (E.3) nadelförmiger Hauptspross mit Blüten.

### 3.2.1.7 Die Entwicklung der *pCLV1:CKX1* transgenen Pflanzen

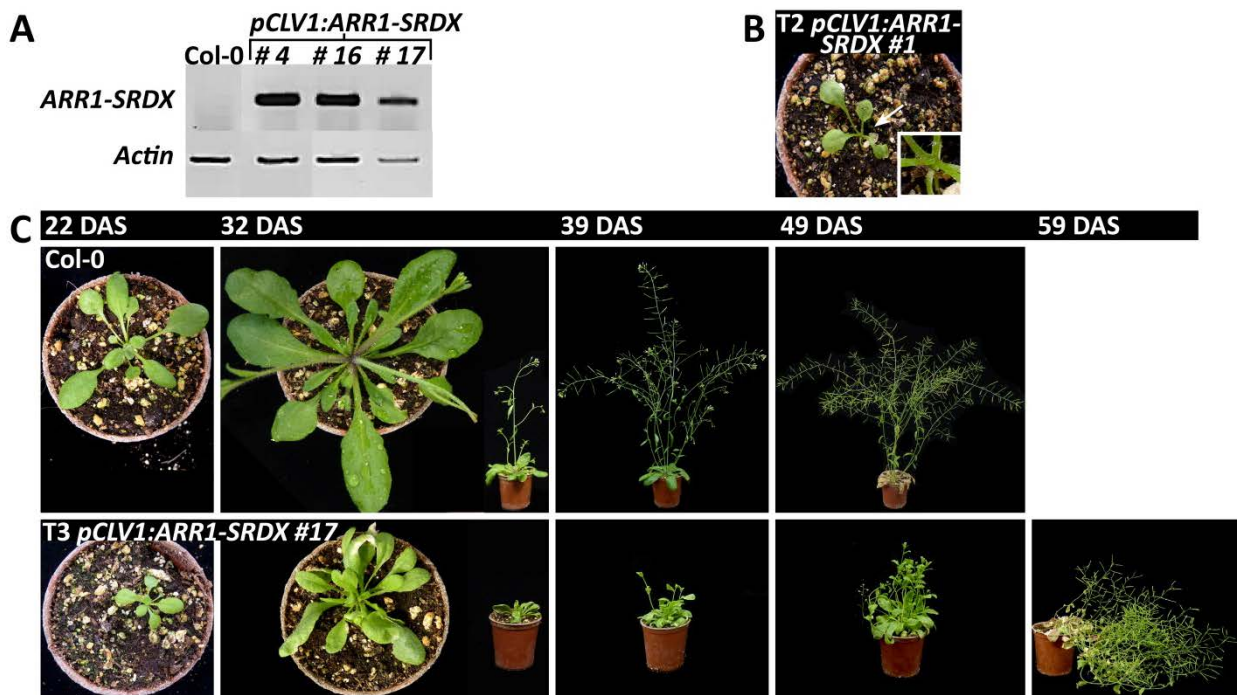
Von 35 untersuchten *pCLV1:CKX1* T<sub>1</sub>-Pflanzen waren 30 kleiner als der Wildtyp. Ausgehend von diesen Pflanzen wurden 15 homozygote T<sub>3</sub>-Linien erzeugt, von denen zwei Linien den zuvor gezeigten Phänotyp verloren hatten. Alle anderen Linien zeigten, verschieden stark ausgeprägt, den T<sub>1</sub>-Phänotyp. Keimlinge von drei T<sub>3</sub>-Linien wurden mit semiquantitativer RT-PCR auf die Transkription des Transgens hin untersucht, wobei in allen drei Linien das Transkript nachgewiesen wurde (Abbildung 17A). In Abbildung 17B ist die Entwicklung der homozygoten T<sub>3</sub>-Linie #8 dargestellt. Der Rosettendurchmesser der transgenen Pflanzen war während der gesamten Entwicklung kleiner als beim Wildtyp. 32 DAS blühten sowohl die Kontroll- als auch die transgenen Pflanzen, die Infloreszenzen der letzteren waren jedoch kürzer und weniger verzweigt als bei der Kontrolle. Auch 39 DAS und 49 DAS war die Infloreszenz der *pCLV1:CKX1* Pflanzen kleiner.



**Abbildung 17** Nachweis der Transgen-mRNA und Phänotyp der *pCLV1:CKX1* transgenen Pflanzen. (A) mRNA von transgenem *CKX1* wurde in Keimlingen von drei unabhängigen, homozygoten T<sub>4</sub>-Linien nachgewiesen. Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR, 25 PCR-Zyklen. (B) Vergleich von Wildtyp- und transgenen Pflanzen während verschiedener Entwicklungsstadien. *pCLV1:CKX1* transgene Pflanzen sind während aller Stadien kleiner als der Wildtyp, in ihrer Entwicklung aber nicht verlangsamt.

### 3.2.1.8 Die Entwicklung der *pCLV1:ARR1-SRDX* transgenen Pflanzen

Die Primärtransformanten mit dem *pCLV1:ARR1-SRDX*-Konstrukt entwickelten buschige Rosetten und viele dünne, gleichzeitig wachsende Infloreszenzsprosse. Ausgehend von 22 T<sub>1</sub>-Pflanzen wurden 16 unabhängige T<sub>2</sub>-Linien (= spaltende Generation) phänotypisch untersucht. Von diesen zeigten 15 Linien den T<sub>1</sub>-Phänotyp, eine Linie war Wildtyp-ähnlich. In Keimlingen von drei homozygoten T<sub>3</sub>-Linien wurde durch semiquantitative RT-PCR die Transkription des Transgens nachgewiesen (Abbildung 18A).



**Abbildung 18** Nachweis der Transgen-mRNA und Phänotyp der *pCLV1:ARR1-SRDX* transgenen Pflanzen.

(A) *ARR1-SRDX* mRNA wurde in Keimlingen von drei unabhängigen, homozygoten T<sub>3</sub>-Linien nachgewiesen. Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR, 25 PCR-Zyklen.

(B) Kanamycinselektierte *pCLV1:ARR1-SRDX* Pflanze. Der Pfeil zeigt auf den Sprossapex ohne SAM (im Kasten vergrößert abgebildet).

(C) Vergleich von Wildtyp- und transgenen Pflanzen während verschiedener Entwicklungsstadien. *pCLV1:ARR1-SRDX* transgene Pflanzen sind langsamer in der Entwicklung und langlebiger als der Wildtyp, bilden buschige Rosetten und anstatt eines Hauptssprosses viele gleichberechtigte, kleine Sprosse.

Ca. 30 % der Pflanzen, die auf Kanamycin angezogen wurden (Abbildung 18B), verloren nach der Bildung weniger Blätter ihr Hauptmeristem und bildeten Seitenrosetten. Bei Pflanzen, die durchgehend ohne Selektionsmarker kultiviert wurden, wurde dies nicht beobachtet. In Abbildung 18C ist exemplarisch für alle Linien die Entwicklung der homozygoten T<sub>3</sub>-Linie #17 (auf Erde angezogen, kein Kanamycin) dokumentiert. Die *pCLV1:ARR1-SRDX* Pflanzen zeigten nach der Keimung ein verlangsamtes Wachstum. 22 DAS waren die Rosetten deutlich kleiner als beim



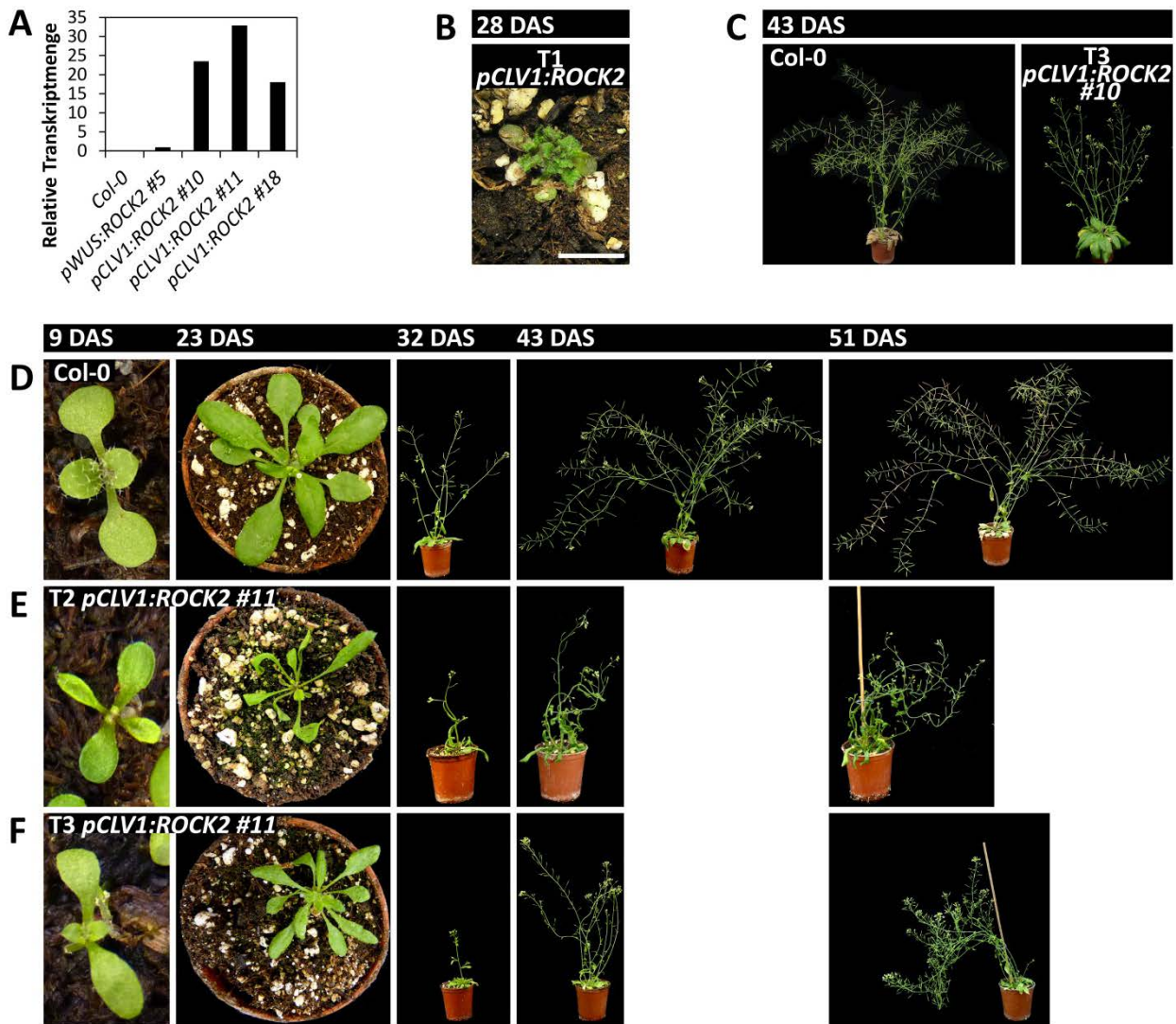
Wildtyp. Dieser hatte 32 DAS bereits einen blühenden Spross entwickelt, während die transgenen Pflanzen noch im Rosettenstadium waren. Der Rosettendurchmesser war nach wie vor kleiner als beim Wildtyp, jedoch konnte die Bildung mehrerer Seitenrosetten beobachtet werden. 39 DAS waren bei den transgenen Pflanzen einige kurze Infloreszenzsprosse sichtbar, es war jedoch noch keine Blüte geöffnet. 49 DAS blühten die Pflanzen, die Rosetten waren sehr buschig und viele kleine Infloreszenzsprosse wuchsen gleichzeitig. Die Pflanzen waren ca.  $\frac{1}{4}$  so hoch wie die Kontrollpflanzen, deren Rosettenblätter bereits größtenteils abgestorben waren. Nach 59 Tagen waren die Col-0 Pflanzen abgereift und tot, die buschigen Sprosse und die Schoten der transgenen Linie waren jedoch noch grün, nur die Rosettenblätter seneszierten.

### 3.2.1.9 Die Entwicklung der *pCLVI:ROCK2* transgenen Pflanzen

Pflanzen mit *pCLVI:ROCK2* Transgen zeigten in der T<sub>1</sub>-Generation eine abnormale Entwicklung. Viele Transformanten waren extrem kleinwüchsig und starben bald (Typ A Phänotyp, Abbildung 19B). Der Großteil der überlebenden Pflanzen war klein (ca. 10 - 20 cm hoch) und entwickelte eingerollte, verdrehte Blätter, bei manchen waren die Schoten keulenförmig verdickt (Typ B Phänotyp). Insgesamt wurden über 50 T<sub>1</sub>-Pflanzen pikiert, jedoch konnten daraus nur 15 fertile T<sub>2</sub>-Linien erzeugt werden, die alle vom Typ B Phänotyp waren (Abbildung 19E).

Die transgenen Pflanzen reagierten sehr empfindlich auf das Kanamycin im Selektionsmedium. T<sub>2</sub>-Pflanzen, die auf Antibiotikum angezogen wurden, waren häufig verkrüppelt oder zwergwüchsig und starben ohne geblüht zu haben. Wurden die gleiche Linie dagegen auf Erde angezogen, entwickelten die Pflanzen den Typ B Phänotyp, blühten und setzten Samen an. Die keulenförmigen Schoten, die bei den T<sub>1</sub>-Pflanzen beobachtet worden waren, wurden nur noch bei einer T<sub>2</sub>-Linie registriert. Da *pCLVI:ROCK2* transgene Keimlinge einen charakteristischen Phänotyp zeigten (Abbildung 19E, längliche Kotyledonen mit z.T. hochgebogenen Rändern, spitze Blättchen), wurden die Pflanzen in der T<sub>2</sub>-Generation optisch selektiert, um Selektionsstress auf Kanamycin zu vermeiden.

Es wurden 12 unabhängige homozygote T<sub>3</sub>-Linien erzeugt. Von diesen zeigten sieben einen neuen Phänotyp, der als Typ C bezeichnet wird. Diese Pflanzen entwickelten im Vergleich zum Wildtyp eine fast doppelt so große Rosette mit mehr Rosettenblättern und einen kräftigeren Infloreszenzpross mit gestörter Blütenphylloaxis (Abbildung 19C). Die Entwicklung war verzögert. Die Pflanzen der anderen fünf homozygoten T<sub>3</sub>-Linien zeigten einen abgeschwächten Typ B-Phänotyp (Abbildung 19F), wobei innerhalb mancher Linien sowohl Typ-B als auch Typ-C Pflanzen vorkamen. In dieser Generation fiel bei den Typ B Pflanzen außerdem eine leicht vergrößerte Infloreszenz auf. Blickte man von oben darauf, waren mehr Knospen sichtbar als beim Wildtyp und das SAM war nicht durch Knospen verdeckt.



**Abbildung 19** Nachweis der Transgen-mRNA und Phänotyp der *pCLV1:ROCK2* transgenen Pflanzen. (A) *ROCK2* mRNA wurde per qRT-PCR in Keimlingen von drei unabhängigen, homozygoten T<sub>3</sub>-Linien nachgewiesen. (B) T<sub>1</sub>-Pflanze vom Typ A. Maßstab 5 mm. (C) T<sub>3</sub>-Pflanze vom Typ C Phänotyp. (D - F) Vergleich von Wildtyp- (D) und transgenen Pflanzen mit Typ B Phänotyp der T<sub>2</sub>- und T<sub>3</sub>-Generationen (E, F) während verschiedener Entwicklungsstadien. Transgene Keimlinge entwickeln längliche Kotyledonen und spitze Blättchen. Ältere Pflanzen bilden eingerollte Blätter, zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine verlangsamte Entwicklung und sind kleiner. Der Phänotyp ist in der T<sub>3</sub>- (F) schwächer ausgeprägt als in der T<sub>2</sub>-Generation (E).

Die hier exemplarisch gezeigte Linie #11 entwickelte in der T<sub>2</sub>-Generation (Abbildung 19D) den erwähnten Keimlingsphänotyp und später eine stark verkleinerte Rosette mit dünnen, eingerollten Blättern. Der Infloreszenzspross war im Vergleich zum Wildtyp sehr klein und wuchs nicht aufrecht. Die Blätter an den Infloreszenzsprossen waren missgestaltet und die Schoten waren klein aber nicht keulenförmig. Homozygote T<sub>3</sub>-Pflanzen der gleichen Linie (Abbildung 19E) entwickelten einen im Vergleich zur T<sub>2</sub>-Generation abgeschwächten Keimlingsphänotyp. Die Ränder der Kotyledonen waren nicht nach oben gebogen und die ersten Blättchen weniger spitz. Nach 23 Tagen war die gebildete

Rosette kleiner als beim Wildtyp, gleichzeitig aber größer als bei den T<sub>2</sub>-Pflanzen. Auch in späteren Stadien war der Phänotyp der T<sub>3</sub>-Pflanzen im Vergleich zur T<sub>2</sub>-Generation abgeschwächt.

Durch qRT-PCR wurde in Keimlingen von drei unabhängigen T<sub>3</sub>-Linien die Expression des Transgens nachgewiesen. Unter diesen drei Linien waren sowohl zwei, die in der T<sub>3</sub>-Generation den Typ C Phänotyp zeigten (Linie #10 und #18), als auch eine, die weiterhin einen abgeschwächten Typ B zeigte (Linien #11). Die Transkriptmenge von *ROCK2* war in der Linie #11 am größten (RQ = 32), die Linien #10 und #18 enthielten dagegen weniger Transkript (RQ = 17 bzw. 24).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein künstliches Cytokininsignal in der *pCLV1*-Domäne zu kleinwüchsigen Pflanzen mit veränderter Blattmorphologie führt. In späteren Generationen kann die Expression des gleichen Transgens jedoch auch zu vergrößerten, langsamer wachsenden Pflanzen führen.

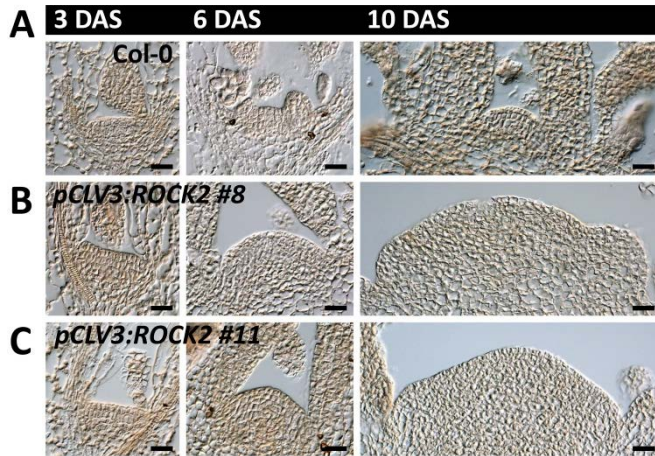
### **3.2.2 Weiterführende Charakterisierung der *pCLV3:ROCK2* transgenen Pflanzen**

Da eine genaue Untersuchung aller transgener Linien den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte, wurde entschieden, nur eine Pflanzengruppe weiter zu verfolgen. Wegen ihres auffällig vergrößerten Sprossmeristems wurden die Pflanzen mit *pCLV3:ROCK2* Transgen für nähere Untersuchungen ausgewählt. Ein weiterer Vorteil dieser Pflanzen war die Stabilität des vergleichsweise uniformen Phänotyps über mehrere Generationen, des Weiteren war die Erzeugung homozygoter Linien ohne Probleme möglich. Alle Untersuchungen wurden an homozygoten Individuen von zwei unabhängigen Linien durchgeführt (Linien #8 und #11, T<sub>4</sub>-Generation). Es zeigte sich, dass die Pflanzen der Linie #11 in allen Untersuchungen einen extremeren Phänotyp aufwiesen als die der Linie #8.

#### **3.2.2.1 Entwicklung der Sprossmeristeme von *pCLV3:ROCK2* transgenen Pflanzen**

Bei blühenden *pCLV3:ROCK2* Pflanzen war das SAM teilweise so groß, dass es mit bloßem Auge erkennbar war, die Keimlinge dieser Pflanzen sahen oberflächlich betrachtet jedoch aus wie der Wildtyp. Um herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt die Vergrößerung des SAM einsetzt, wurden Längsschnitte durch den Sprossapex von drei, sechs und zehn Tage alten Keimlingen angefertigt und im Durchlichtmikroskop betrachtet (Abbildung 20). Drei Tage nach der Aussaat waren die Meristeme der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nur wenig vergrößert, die L1- und die L2-Schicht waren deutlich erkennbar. Nach sechs Tagen hatte sich die SAM-Größe bei den transgenen Keimlingen jedoch ungefähr vervierfacht, die klonalen Meristemschichten waren im SAM-Zentrum aber noch sichtbar. Die Größe und Organisation des Wildtyp-SAM war unverändert. Nach zehn Tagen maßen die Meristeme der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen im Durchmesser schon bis zu 200 µm, von den

Meristemschichten war nur noch die L1 erkennbar. Außerdem wurden Blütenprimordien gebildet. Das Wildtypmeristem war im Vergleich ca. 40 µm breit, der Aufbau der klonalen Schichten unverändert und es wurden keine Blütenprimordien beobachtet.



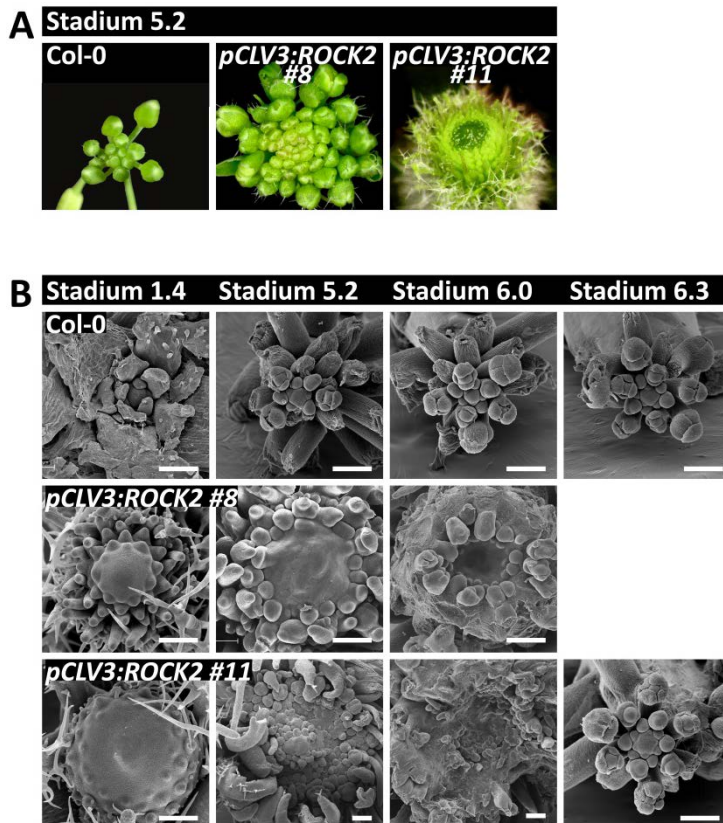
**Abbildung 20** Längsschnitte durch vegetative Sprossmeristeme von Arabidopsis.

(A) Col-0, (B) *pCLV3:ROCK2 #8*, (C) *pCLV3:ROCK2 #11* Pflanzen. 3 DAS sind die Meristeme aller drei Linien nahezu gleich groß. Das Wildtyp-SAM verändert seine Größe während der vegetativen Phase nicht, die Meristeme der transgenen Linien werden dagegen immer größer. Maßstab 20 µm.

Nach den vegetativen Keimlingsmeristemen wurden auch die Infloreszenzmeristeme genauer betrachtet. Bereits mit bloßem Auge war eine auffällige Veränderung der Infloreszenzen der transgenen Linien zu beobachten (Abbildung 21A). Pflanzen der Linie #8 akkumulierten zu Beginn der Sprosselongation eine große Zahl von geschlossenen Blütenknospen in einer scheibenförmigen Anordnung. Pflanzen der Linie #11 wuchsen entweder ähnlich wie die der Linie #8 oder sie elongierten einen Spross, der anstatt Knospen eine große Zahl radialsymmetrischer Organe unbekannter Identität trug. Am Sprossapex dieser Pflanzen war das nackte, stark vergrößerte SAM deutlich sichtbar. Bei solchen Pflanzen setzte die Bildung und Akkumulation von Blütenknospen erst nach der Sprosselongation ein. Zu Blühbeginn war das SAM schließlich von Knospen verdeckt. Bei manchen der zuletzt genannte Pflanzen vertrocknete der Sprossapex oder rollte sich ein. Diese Pflanzen starben, ohne geblüht zu haben.

Die Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop bestätigten die extremen Veränderungen des SAM bei den transgenen Linien (Abbildung 21B) während verschiedener Wachstumsphasen. Die Einteilung des Pflanzenwachstums in verschiedene Stadien erfolgte nach Boyes *et al.* (2001). Es zeigte sich, dass sich die Meristeme der transgenen Pflanzen vor der Blühphase kontinuierlich vergrößerten. Zu Beginn der Sprosselongation (Beginn Stadium 5) wurde die maximale SAM-Größe (Durchmesser bei Linie #11 bis zu ca. 1,5 mm) erreicht. Zu diesem Zeitpunkt waren die Meristeme stark deformiert und ausgebeult, bei der Linie #11 bilden sich auf der gesamten SAM-Oberfläche Primordien und kleine Extrameristeme. Nach dem Öffnen der ersten Blüte (Beginn Stadium 6) begannen die Meristeme, kleiner zu werden, das SAM-Zentrum war konkav. Zu diesem Zeitpunkt verschwanden bei dem

Meristemen der Linie #8-Pflanzen die Ausbeulungen. Die Oberfläche der Meristeme von Pflanzen der Linie #11 war nach wie vor ungeordnet und z.T. faltig. Nachdem ca. 30 % aller zu bildender Blüten geöffnet waren (Stadium 6.3), hatte sich die Meristemmorphologie normalisiert. Das SAM von Pflanzen der Linie #11 war im Aufbau Wildtyp-ähnlich, im Vergleich zu diesem jedoch ca. 1,4-mal so groß.



**Abbildung 21** Morphologie von Arabidopsis *pCLV3:ROCK2* Infloreszenzmeristemen während verschiedener Wachstumsphasen. Die Einteilung des Pflanzenwachstums in verschiedene Stadien erfolgte nach Boyes *et al.* (2001).

(A) Sprossapices von Wildtyp und transgenen Linien während Stadium 5.2 (der Infloreszenzspross beginnt zu wachsen, noch keine Blüte geöffnet).

(B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp- und *pCLV3:ROCK2* Infloreszenzmeristemen während verschiedener Wachstumsphasen.

Die Infloreszenzen Col-0 Pflanzen haben nach 15 Tagen (Stadium 1.4, vier Rosettenblätter > 1 mm) nur Blattprimordien produziert. Nach dem Wechsel von vegetativer zu generativer Aktivität (Stadium 5) verändert sich die SAM-Größe und Form nicht mehr.

Die Meristeme von *pCLV3:ROCK2* #8 Pflanzen sind nach 15 Tagen stark vergrößert und produzieren radialsymmetrische Organe. Während der Akkumulation von Blütenknospen in Stadium 5.2 vergrößert sich das SAM, die Oberfläche ist unregelmäßig ausgebeult. Nach dem Öffnen der ersten Blüte (Stadium 6.0) wird das SAM kleiner und konkav.

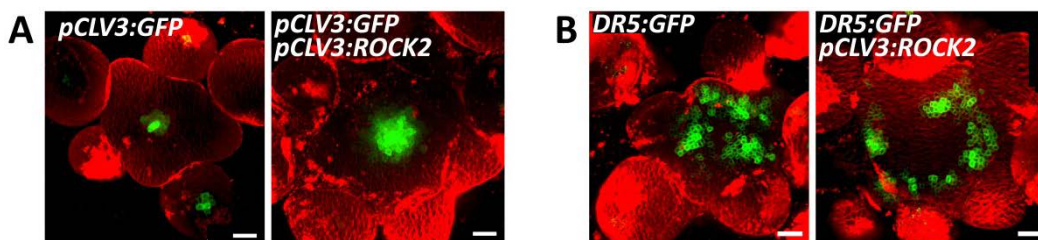
Die Meristeme von *pCLV3:ROCK2* #11 Pflanzen sind nach 15 Tagen noch größer als die der Linie #8 und bereits ausgebeult. In Stadium 5.2 ist das SAM ungeordnet, fast auf der ganzen Oberfläche werden Primordien gebildet. Während Stadium 6 wird das SAM konkav, es bilden sich Falten, und die Primordienbildung verlagert sich an den Rand. Mit fortschreitender Blühphase (in Stadium 6.3 sind ca 30 % aller zu bildenden Blüten geöffnet) normalisiert sich die SAM-Morphologie, das Meristem ist dem Wildtyp ähnlich, jedoch etwa 1,4-mal so groß.

Alle Maßstäbe 200  $\mu$ m.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Vergrößerung der transgenen Meristeme spätestens mit der Keimung begann und sich bis zum Beginn der Blühphase fortsetzte. Kurz vor dem Öffnen der ersten Blüte erreichten die Meristeme die größte Ausdehnung, gleichzeitig waren sie in ihrer Organisation extrem gestört. Je größer die Meristeme wurden, desto weniger waren die drei klonal getrennten Meristemschichten L1 – L3 sichtbar und desto unregelmäßiger war die Anordnung der Zellen. Während des Wachstums des blühenden Sprosses wurde das SAM wieder kleiner und seine Organisation normalisierte sich.

### 3.2.2.2 Expression von zwei verschiedenen *GFP*-Reporterlinien in *pCLV3:ROCK2* transgenen Pflanzen

Da unklar war, ob bei den vergrößerten Meristemen der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen die verschiedenen funktionalen Zonen erhalten blieben, wurde das fluoreszierende Stammzellenmarkerkonstrukt *pCLV3:GFP* in die transgenen Pflanzen eingekreuzt. Die Untersuchung der heterozygoten F<sub>1</sub>-Pflanzen (aus zeitlichen Gründen wurden noch keine homozygoten Linien erzeugt) zeigte, dass die Stammzellendomäne vergrößert war, doch das traf auch auf die Periphere Zone zu (Abbildung 22A). Die untersuchten F<sub>1</sub>-Pflanzen zeigten nur einen moderaten *pCLV3:ROCK2* Phänotyp, was wahrscheinlich dadurch bedingt war, dass das Transgen heterozygot vorlag. Die Zellidentitäten bei extrem vergrößerten und missgebildeten Meristemen konnten daher noch nicht untersucht werden.



**Abbildung 22** Expression verschiedener *GFP*-Reporterlinien in Infloreszenzmeristemen von *pCLV3:ROCK2* Pflanzen.

(A) Die durch *pCLV3:GFP* grün markierte Stammzellendomäne ist in *pCLV3:ROCK2* Pflanzen vergrößert.

(B) Das *DR5:GFP* Signal ist in Kontroll- und *pCLV3:ROCK2* Pflanzen am äußeren Rand der PZ lokalisiert.

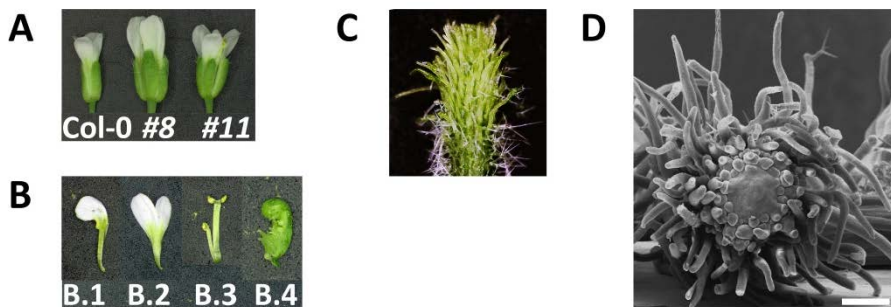
Grün = GFP, Rot = Plasmamembran gefärbt mit Synapto Red<sup>TM</sup> C2. Maßstab 25 µm.

Da vor allem bei Pflanzen der Linie #11 die Primordienbildung extrem gestört war, wurde untersucht, inwiefern die Verteilung der Auxinmaxima in den transgenen Meristemen verändert war. Auxin akkumuliert in jungen Primordien (Reinhardt *et al.* 2000). Für die Untersuchung wurde der synthetische Auxinreporter *DR5:GFP* (Friml *et al.* 2003) in die *pCLV3:ROCK2* Pflanzen eingekreuzt (Abbildung 22B). Wie beim Wildtyp waren in den gekreuzten Pflanzen mehrere ringförmig um das SAM-Zentrum angeordnete GFP-Signale zu beobachten. Die GFP-freie Fläche im SAM-Zentrum war bei den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen größer als bei den Kontrollpflanzen. Da auch hier nur heterozygote

F<sub>1</sub>-Pflanzen mit abgeschwächtem Phänotyp untersucht wurden, konnten keine Aussagen über die Auxinmaxima in den stark deformierten Meristemen der Pflanzen der Linie #11 getroffen werden.

### 3.2.2.3 Blütenmerkmale von *pCLV3:ROCK2* transgenen Pflanzen

Die Blüten der transgenen Pflanzen waren gegenüber denen des Wildtyps verändert. Sie waren um bis zu ca. 25 % vergrößert (Abbildung 23A) und entwickelten eine veränderte Anzahl von Blütenorganen (Tabelle 12). Normalerweise setzt sich eine Arabidopsisblüte aus 4 Kelch-, 4 Kron-, 6 Staub- und zwei verwachsenen Fruchtblättern zusammen. Bei 20 untersuchten Wildtypblüten wich keine von diesem Schema ab. Bei 20 untersuchten Blüten der Linie #8 wurden dagegen häufig abweichende Zahlen registriert. So wurden 9-mal 4, 9-mal 5 und zweimal 6 Kelchblätter gezählt, weiterhin 11-mal 4 und 9-mal 5 Kronblätter sowie 4-mal 4, 10-mal 5 und 6-mal 6 Staubblätter. Häufig (nicht genauer quantifiziert) wurden missgebildete Blütenorgane beobachtet. Manche Kronblätter trugen an ihren Rändern Staubbeutel (Abbildung 23B.1), andere Kronblätter waren verdoppelt (Abbildung 23B.2). Es traten auch doppelte Staubblätter auf, z.T. waren die Theken voneinander getrennt (Abbildung 23B.3). Weiterhin wurden sekundäre, missgebildete Gynoecien beobachtet (Fruchtblatt nicht geschlossen, fehlendes Stigma), die neben dem eigentlichen Gynoecium wuchsen (Abbildung 23B.4).



**Abbildung 23** Blütenmerkmale der *pCLV3:ROCK2* transgenen Pflanzen.

- (A) Blütengröße: Transgene *pCLV3:ROCK2* Pflanzen bilden größere Blüten als der Wildtyp.  
 (B) Missbildungen von *pCLV3:ROCK2* Blütenorganen: (B.1) ein Kronblatt mit Staubbeutel, (B.2) ein doppeltes Kronblatt, (B.3) ein missgebildetes, doppeltes Staubblatt mit getrennten Theken, (B.4) ein offenes Gynoecium ohne Stigma.  
 (C) Sprossapex einer *pCLV3:ROCK2* Pflanze mit filiformen Blüten.  
 (D) REM Aufnahme von filiformen Blüten einer *pCLV3:ROCK2* Pflanze. Maßstab 500 µm.

**Tabelle 12** Anzahl der Blütenorgane von *pCLV3:ROCK2* Pflanzen. Angegeben ist, wie häufig in 20 untersuchten Blüten eine bestimmte Anzahl von Kelch-, Kron- oder Staubblättern auftrat.

Organ	Col-0 (20 Pfl.)	<i>pCLV3:ROCK2</i> #8 (20 Pfl.)
Kelchblätter	4x (20 Pfl.)	4x (9 Pfl.) / 5x (9 Pfl.) / 6x (2 Pfl.)
Kronblätter	4x (20 Pfl.)	4x (11 Pfl.) / 5x (9 Pfl.)
Staubblätter	6x (20 Pfl.)	4x (4 Pfl.) / 5x (10 Pfl.) / 6x (6 Pfl.)

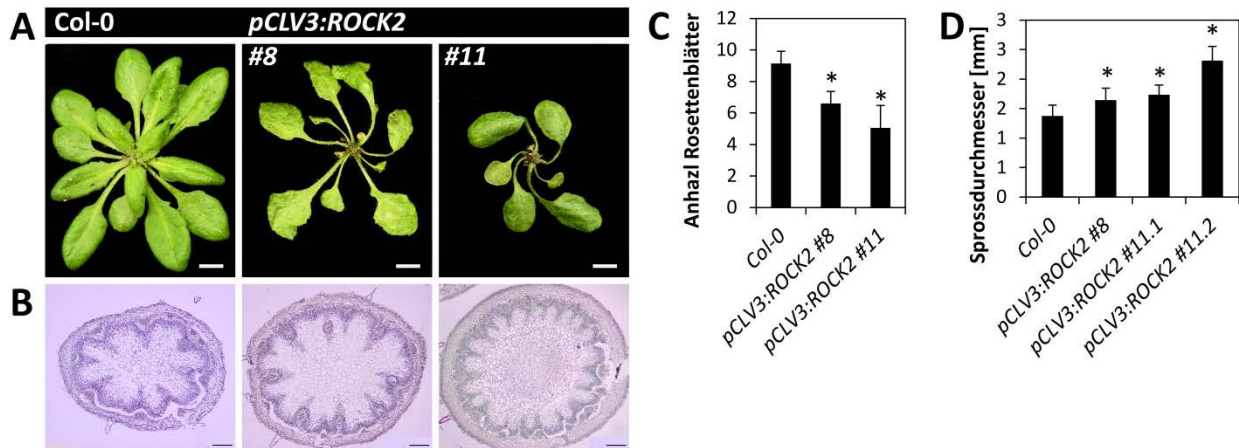
#### 3.2.2.4 Vegetative Merkmale der *pCLV3:ROCK3* transgenen Pflanzen

Bei den transgenen Pflanzen war auch eine veränderte Morphologie der Rosetten und der Sprosse zu beobachten. So war der Rosettendurchmesser im Vergleich zum Wildtyp um ca. 20 – 40 % verkleinert und es wurde meist nur eine Seitenrosette gebildet, während der Wildtyp bis zu 12 Seitenrosetten anlegte (Abbildung 24A). Die Blätter der transgenen Pflanzen waren dunkelgrün und ledrig und bei Linie #11 konvex gewölbt. Die Blätter der Linie #8 waren dagegen an den Rändern gezackt. Die Zahl der Primärrosettenblätter lag bei den beiden transgenen Linien durchschnittlich bei  $6,6 \pm 1,4$  bzw.  $5,1 \pm 1,9$  Blättern, der Wildtyp bildete im Vergleich dazu  $9,1 \pm 0,8$  Blätter pro Primärrosette (Abbildung 24C).

Des Weiteren entwickelten die *pCLV3:ROCK2* Pflanzen eine um 19 - 68 % dickere Sprossachse (Abbildung 24D). Der Wildtyp bildete in der Sprossachse 8 – 9 Leitbündel aus, während bei den Pflanzen der Linie #8 12 – 14 Bündel und bei den Pflanzen der Linie #11 20 – 25 Bündel gezählt wurden (Abbildung 24B). Die Anordnung des Leitgewebes war trotz des vergrößerten Durchmessers weitgehend normal. Bei beiden Linien wurden gelegentlich runde Leitbündel registriert, bei denen das Phloem von einem Ring aus Xylem umgeben war (Bei Abbildung 24B bei Linie #8 sichtbar). Bei der Linie #11 war der Abstand zwischen den einzelnen Bündeln reduziert. Der Cortex enthielt zwei bis drei mehr Zellschichten als der des Wildtyps.

Bei den Pflanzen der Linie #11 trat in ca. der Hälfte aller Aussaaten ein besonders extremer *pCLV3:ROCK2* Phänotyp auf (als #11.2-Phänotyp bezeichnet), der 20 % - 50 % aller Pflanzen betreffen konnte. Diese Pflanzen entwickelten sich zunächst gleich wie alle anderen Pflanzen der Linie #11, deren Phänotyp hier als #11.1-Phänotyp bezeichnet werden soll. Doch während #11.1 Pflanzen normal blühten, stellen die Pflanzen mit dem #11.2-Phänotyp ihr Wachstum ein. Der Sprossapex rollte sich ein, teilweise spaltete er sich auf oder vertrocknete. Fertile Blüten wurden nur selten gebildet. Allen #11.2 Pflanzen ist eine stark verdickte Sprossachse (bis zu 68 % dicker als beim Wildtyp) gemeinsam. Die Ursache für das gelegentliche Auftreten dieses Phänotyps ist nicht bekannt.





**Abbildung 24** Rosettengröße und Sprossdurchmesser *pCLV3:ROCK2* transgener Pflanzen.

(A) Rosetten von Wildtyp und transgenen Pflanzen. Maßstab 1 cm.

(B) Mit Toluidinblau gefärbte Sprossquerschnitte von Wildtyp und transgenen Pflanzen.

Maßstab 200 µm.

(C) Anzahl der Rosettenblätter von Wildtyp und transgenen Pflanzen.

n = 20 (#8, #11) / n = 14 (Col-0). [t-Test]: \* = p < 0,01.

(D) Sprossdurchmesser von Wildtyp und transgenen Pflanzen. *pCLV3:ROCK2* #11.1 bezeichnet Pflanzen mit dem beschriebenen Transgenphänotyp. Pflanzen mit *pCLV3:ROCK2* #11.2 Phänotyp stellen ihr Längenwachstum wegen abnormaler Entwicklungen der Sprossspitze ein (Aufspaltung des SAM, Einrollen oder Vertrocknen des Sprossapex) und entwickeln verdickte Sprosse. n = 15 (Col-0, #8, #11.1) / n = 10 (#11.2). [t-Test]: \* = p < 0,01.

### 3.2.2.5 Das *pCLV3:ROCK2* Transgen im Hintergrund verschiedenener Meristemmutanten

Abschließend wurde untersucht, ob die Ausprägung des *pCLV3:ROCK2* Phänotyps von der Aktivität bestimmter genetischer Regulatoren im SAM abhängt bzw. ob das konstitutive Cytokininsignal in den Stammzellen, das durch das *pCLV3:ROCK2* Transgen hervorgerufen wird, genetische Meristemdefekte verändern kann. Dazu wurden *pCLV3:ROCK2*-Pflanzen mit den Meristemmutanten *clv3-2*, *wus-4*, *stm-1C*, *bum1* bzw. *gor* gekreuzt und die Pflanzen der F<sub>2</sub>-Generationen analysiert.

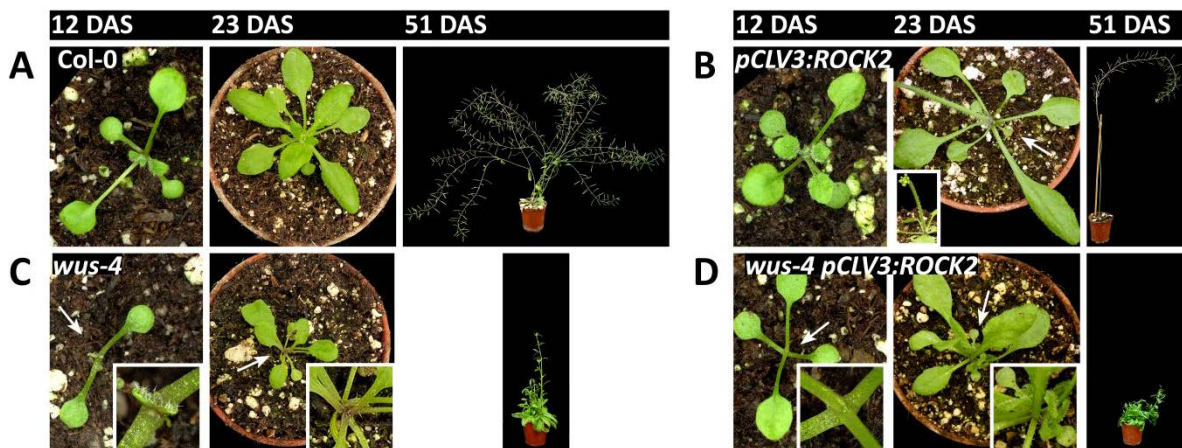
In *clv3-2* Mutanten ist ein Gen defekt, das in den Stammzellen exprimiert wird und für ein CLE-Signalpeptid kodiert (Fletcher *et al.* 1999). Das Peptid ist Teil des CLV-WUS-Regelkreislaufs, der die gleichbleibende Größe des Stammzellenpools gewährleistet (s. Abschnitt 1.2.2)

, (Schoof *et al.* 2000; Brand *et al.* 2001)). *clv3-2* Mutanten bilden vergrößerte Meristeme, da *WUS* nicht reprimiert wird und der Transkriptionsfaktor ungehindert die Zellteilung der Stammzellen anregen kann. Im *clv3-2* Hintergrund bewirkte das *pCLV3:ROCK2* Transgen eine dramatische Vergrößerung des Infloreszenzmeristems (Abbildung 25). Dieses war größer als die Meristeme beider Elternpflanzen zusammen.

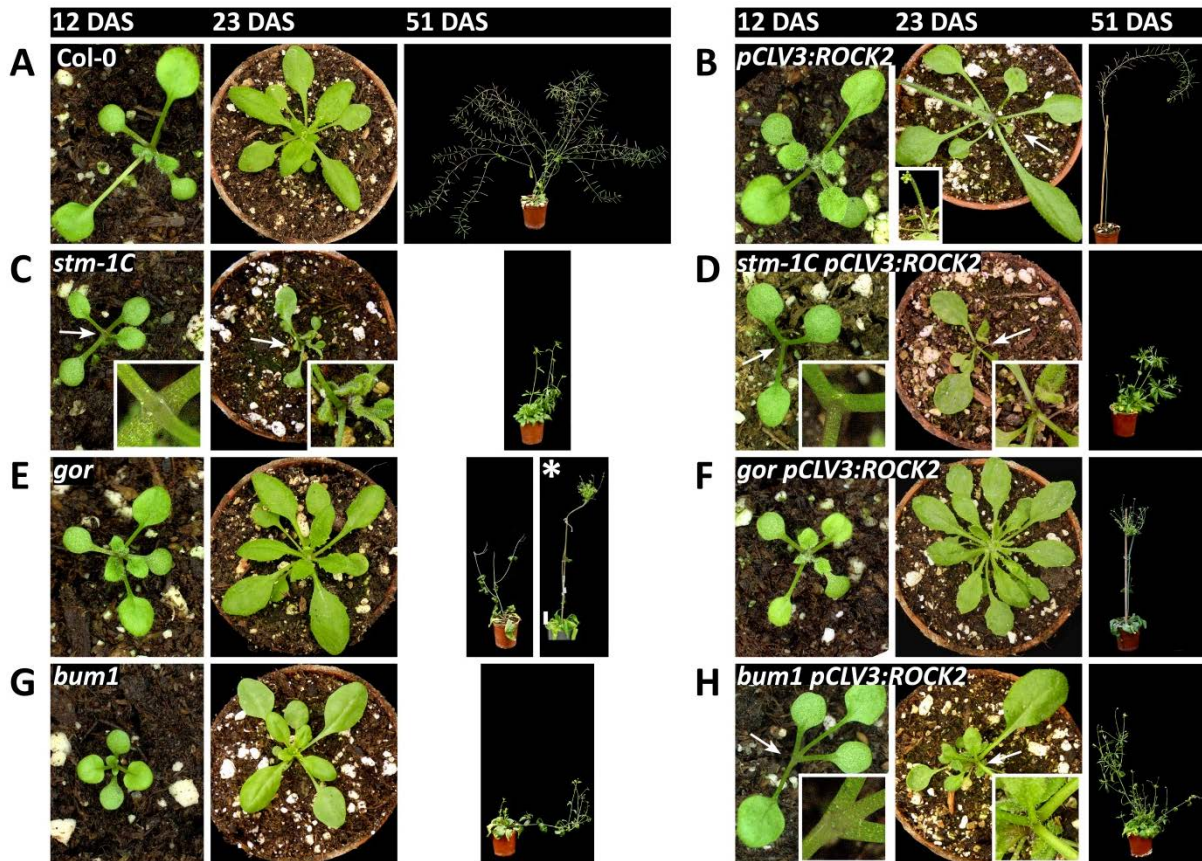


**Abbildung 25** Infloreszenzmeristeme von *clv3-2 pCLV3:ROCK2* Pflanzen. Das SAM der Hybride ist um ein mehrfaches größer als die Meristeme der Elternpflanzen. Pflanzen 23 Tage alt. Die *clv3-2* Mutation liegt im *Ler* Hintergrund vor.

Ist anstatt des *CLV3* Gens das *WUS* Gen defekt, tritt der gegenteilige Phänotyp auf. *wus* Mutanten sind nicht in der Lage, ein funktionierendes SAM zu erhalten (Mayer *et al.* 1998). Bereits im Keimlingsstadium braucht sich das Hauptmeristem auf und axilläre Meristeme werden aktiv. Diese brauchen sich ebenfalls nach der Produktion weniger Blätter auf. Nach einigen Durchläufen dieser Art (*stop-and-go* Zyklen) elongierten die Pflanzen einen abnormal verzweigten Spross, der wenige sterile Blüten produziert. Die Einführung des *pCLV3:ROCK2* Transgens in den *wus-4* Hintergrund (Leibfried *et al.* 2005) bewirkte keine Veränderung des *wus* Phänotyps (Abbildung 26). Die *wus-4* Mutation überdeckt also den *pCLV3:ROCK2* Phänotyp, bzw. die Ausprägung des transgenen Phänotyps hing von der Aktivität des *WUS* Gens ab.



**Abbildung 26** Entwicklung der *wus-4 pCLV3:ROCK2* Pflanzen. (A) Wildtyp, (B) *pCLV3:ROCK2* (Der Kasten zeigt die Seitenansicht des Sprosses), (C) *wus-4*, (D) *wus-4 pCLV3:ROCK2*. Die Hybriden zeigen den gleichen *stop-and-go* Phänotyp wie die nicht-transgenen *wus-4* Mutanten. Die Pfeile zeigen jeweils auf den Vegetationspunkt, der in den Kästen vergrößert gezeigt ist.



**Abbildung 27** Entwicklung der verschiedenen *stm pCLV3:ROCK2* Pflanzen. (A) Wildtyp, (B) *pCLV3:ROCK2*, (C) *stm-1C*, (D) *stm-1C pCLV3:ROCK2*, (E) *gor*, \* = Bild aus Takano *et al.* (2010), da die selbst gezogenen *gor* Pflanzen vertrocknet waren. (F) *gor pCLV3:ROCK2*, (G) *bum1*, (H) *bum1 pCLV3:ROCK2*. Die transgenen Pflanzen mit *stm-1C* bzw. *bum1* zeigen den gleichen „stop-and-go“ Phänotyp wie die nicht transgenen Elternpflanzen. Die Sprossachse der *gor pCLV3:ROCK2* Pflanzen ist dicker als die der *gor* Pflanzen.

Die Funktion des Transkriptionsfaktors STM ist für die Aktivität des SAM unentbehrlich. Starke *stm* Mutanten stellen nach der Bildung von zwei Kotyledonen das Wachstum ein, da sich kein Sprossmeristem etablieren kann (Barton und Poethig 1993). Schwächere *stm* Mutanten zeigen einen ähnlichen *stop-and-go* Phänotyp wie die *wus* Mutanten (Endrizzi *et al.* 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene *stm* Mutanten mit den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen gekreuzt. Die *stm-1* Mutation bewirkt im *Ler* Hintergrund einen starken Phänotyp, die mutierten Pflanzen stellen nach der Keimung das Wachstum ein (Barton und Poethig 1993). Da die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen jedoch größtenteils aus dem Col-0 Hintergrund stammten, wurde für das Kreuzungsexperiment eine *stm-1* Mutante verwendet, die 5-mal in den Col-0 Hintergrund rückgekreuzt worden war. Diese als *stm-1C* bezeichnete Mutante war in der Lage, ein SAM zu etablieren und zeigte einen *stop-and-go* Phänotyp (Takano *et al.* 2010). Einen ähnlichen Phänotyp zeigt auch die *stm-bumpershoot1* Mutante (*bum1*, Jasinski *et al.* 2005). Bei der *gorgon* Mutation handelt es sich um ein hypomorphes STM Allel, was bedeutet, dass STM Protein beschädigt aber nicht funktionslos ist (Takano *et al.* 2010). *gor* Pflanzen sind während der vegetativen Phase nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. In der Blühphase

elongieren die Mutanten jedoch einen Spross, dessen stark verbreiteter Sprossapex gleichzeitig zahlreiche dünne Äste mit sterilen Blüten bildet (Abbildung 27E).

Nachdem das *pCLV3:ROCK2* Transgen in die verschiedenen *stm* Mutanten eingeführt worden war, zeigte sich, dass das Transgen nicht in der Lage war, den u.a. durch Cytokininmangel im SAM bedingten *stm* Phänotyp zu verändern (Abbildung 27). Im *stm-1C* und *bum1* Hintergrund bewirkte das *pCLV3:ROCK2*-Konstrukt keine Veränderung des *stop-and-go* Phänotyps. Auch die *gor* *pCLV3:ROCK2* Pflanzen entwickelten sich, abgesehen von einer dickeren Sprossachse, ähnlich wie die *gor* Mutante. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die verschiedenen *stm* Mutationen epistatisch zu dem *pCLV3:ROCK2* Transgen sind.

### **3.3 Abregulation von *CKX3* und *CKX5* im Sprossapex von *Brassica napus***

Bei der *ckx3 ckx5* Arabidopsismutante war eine Ertragssteigerung um ca. 50 % gegenüber dem Wildtyp gemessen worden (Bartrina 2006). Ertrag ist eines der zentralen Ziele in der Pflanzenzüchtung, daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob ein erhöhter Cytokininstatus im SAM auch in Kulturpflanzen ertragssteigernd wirkt. Raps ist eine nah mit Arabidopsis verwandte Nutzpflanze und wurde als Modell gewählt. Da Raps eine allotetraploide Pflanze ist und Knockoutlinien nicht frei zugänglich sind, wurde eine amiRNA-Strategie zur gezielten Abregulation von *CKX3* und *CKX5* gewählt. Es wurden verschiedene amiRNA-Konstrukte kloniert, in Raps transformiert und die transgenen Pflanzen hinsichtlich ihrer SAM-Entwicklung und ihres Ertrags untersucht.

Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ Lembke) durchgeführt. Die Firma SAATEN-UNION BIOTEC GmbH übernahm die Herstellung und Regeneration der Primärtransformanten, die anschließend von Mitarbeitern der NPZ bonitiert wurden.

#### **3.3.1 Klonierung der Brassica *CKX*-Sequenzen**

Zu Beginn der Arbeit waren von den verschiedenen Brassicaarten nur EST-Sequenzen und wenige BAC-Klone mit genomischer DNA verfügbar (Tabelle 13). Auf ihnen basieren alle in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsarbeiten und das Design der amiRNAs. Es war nicht bekannt, wie viele *CKX*-Kopien in dem polyploiden Rapsgenom vorhanden sind und inwiefern sie sich voneinander unterscheiden.

**Tabelle 13** *Brassica CKX3*- und *CKX5*-Sequenzen. Aufgelistet sind die Sequenzen, die zu Beginn des Projekts zur Verfügung standen bzw. im Rahmen dieses Projekts kloniert wurden. Hinter den Gennamen steht jeweils in Klammern die nachträglich ermittelte Bezeichnung der *B. napus* Genkopie. Diese Zuordnung beruht auf den Rapssequenzen der Bayer CropScience AG (s. Abschnitt 3.3.4).

Gen	Quelle	Sequenzname	Länge
<i>in silico</i> Sequenzen			
<i>BnaCKX3</i> (C2)	NCBI EST	CD843876	707 bp
<i>BnaCKX3</i> (A2)	NCBI EST	ES997020	531 bp
<i>BnaCKX3</i> (C2)	NCBI EST	FG57234	616 bp
<i>BraCKX3</i> (A2)	NCBI EST	EX051024	173 bp
<i>BraCKX3</i> (A2)	NCBI EST	EX055038	138 bp
<i>BraCKX3</i> (A2)	NCBI EST	EX082267	571 bp
<i>BraCKX5</i> (A1)	NCBI BAC-Klon mit genom. DNA	KBrH012I05	2878 bp
<i>BraCKX5</i> (A1)	NCBI BAC-Klon mit genom. DNA	KBrB084P16	2878 bp
<i>BnaCKX5</i> (C1)	NCBI EST	CD825291	558 bp
<i>BnaCKX5</i> (C1)	NCBI EST	EV098708	386 bp
<i>BnaCKX5</i> (A1)	NCBI EST	EV020839	658 bp
<i>BnaCKX5</i> (A1)	NCBI EST	EV134495	384 bp
Im Rahmen der Arbeit klonierte Sequenzen			
<i>BolCKX3</i> (C2)	cDNA aus Keimlingen	<i>BolCKX3</i> cDNA	1572 bp
<i>BraCKX3</i> (A2)	cDNA aus Keimlingen	<i>BraCKX3</i> cDNA	1572 bp
<i>BolCKX5</i> (C1)	cDNA aus Keimlingen	<i>BolCKX5</i> cDNA	1608 bp
<i>BraCKX5</i> (A1)	cDNA aus Keimlingen	<i>BraCKX5</i> cDNA	1608 bp
<i>BraCKX5</i> (A1)	Genomische DNA von BAC-Klon KBrH012I05	<i>BraCKX5</i> Gen	2878 bp
<i>BolCLV1</i>	cDNA aus Keimlingen	<i>BolCLV1</i> cDNA Teil	989 bp
<i>BraCLV1</i>	cDNA aus Keimlingen	<i>BraCLV1</i> cDNA Teil	989 bp

Anhand der bekannten Brassicasequenzen von *CKX3* und *CKX5* (Tabelle 13) wurden Primer für *CKX3* und *CKX5* entworfen (s. Anhang, Tabelle 20). Mit diesen wurden per RT-PCR die cDNA-Sequenzen von *BolCKX3*, *BolCKX5*, *BraCKX3* und *BraCKX5* aus Keimlings-cDNA amplifiziert und kloniert (s. Abschnitt 2.3.5.2). Sowohl für *CKX3* als auch für *CKX5* wurde jeweils nur eine cDNA-

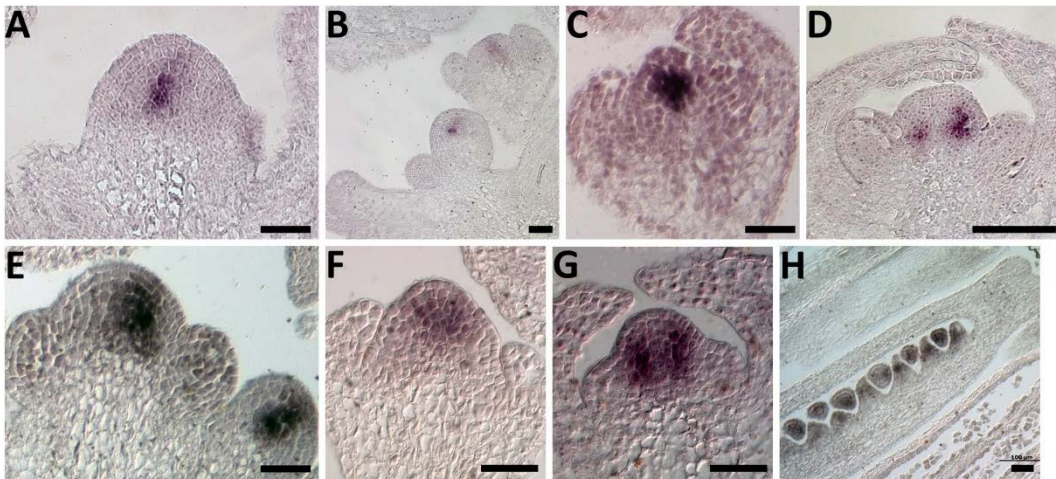
Sequenz identifiziert, obwohl wegen des Mehrfachkopiengenoms von *Brassica* mehr als eine Sequenz pro Gen erwartet worden war. Zusätzlich zu den cDNA-Sequenzen wurde, basierend auf BAC-Klonen, je eine Gensequenz von *BraCKX1* und *BraCKX5* kloniert. Um für die später durchgeführten In-situ-Hybridisierungen eine Positivkontrolle zu haben, wurde außerdem ein 989 bp langes Teilstück der *CLV1* cDNA (sowohl aus *B. rapa* als auch aus *B. oleracea*) kloniert.

### **3.3.2 In-situ-Hybridisierung von *CKX3* und *CKX5* mRNA im Infloreszenzmeristem von *Brassica napus***

Nachdem durch die Sequenzvergleiche und Klonierungen belegt war, dass zu Arabidopsis orthologe *CKX3* und *CKX5* Gene in *Brassica* existieren, sollte durch In-situ-Hybridisierungen untersucht werden, ob diese, so wie in Arabidopsis, im SAM exprimiert werden. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, ob die Gene auch in ihrer Funktion ortholog zueinander sind. Als Matrizen für die RNA-Sonden dienten die zuvor erzeugten *Brassica* cDNA-Klone.

Die Hybridisierungen belegten die Expression beider *CKX* Gene im Infloreszenzmeristem und in Blüten von Raps (Abbildung 28). *CKX3* mRNA wurde im organisatorischen Zentrum des SAM (Abbildung 28A) und junger Blütenmeristeme (Stadium 3 und 4 nach Smyth *et al.* 1990) s. Abbildung 28B, C) nachgewiesen. In älteren Blüten (Stadium 6) wurde Transkript in den Primordien der Fruchtblätter detektiert (Abbildung 28D). *CKX5* war in einem größeren Bereich im SAM-Zentrum (Abbildung 28E) aktiv. Auch im Zentrum von Blüten im Stadium 4 wurde Transkript nachgewiesen (Abbildung 28F). In Blüten im Stadium 5 wurde Aktivität in den frühen Anlagen der Fruchtblattprimordien gezeigt (Abbildung 28G). Zusätzlich wurde mRNA in den Samenanlagen und der Placenta junger Gynoecien nachgewiesen (Abbildung 28H).

Die Hybridisierungsexperimente zeigen, dass die *CKX3* und *CKX5* Expression in Raps mit der in Arabidopsis (Bartrina *et al.* 2011) vergleichbar ist. Ist auch die Funktion der beiden Gene ähnlich, könnte eine Abregulation tatsächlich die Aktivität des SAM beeinflussen.



**Abbildung 28** Lokalisierung von *CKX3* und *CKX5* mRNA in *B. napus* durch In-situ-Hybridisierung.

(A - D) *CKX3* Expression. (A, B) mRNA wurde im organisatorischen Zentrum von Infloreszenzmeristemen, (C) im OZ von Blüten im Stadium 4 (nach Smyth *et al.* 1990) und (D) in Fruchtblattprimordien von Blüten im Stadium 6 detektiert.

(E – H) *CKX5*-Expression. *CKX5* mRNA wurde (E) im OZ von Infloreszenzmeristemen detektiert, (F) im Zentrum von Blüten im Stadium 4, (G) in den Fruchtblattprimordien von Blüten in Stadium 5 und (H) in den Samenanlagen und der Plazenta junger Gynoecien. Alle Maßstäbe 50 µm.

### 3.3.3 Die *Brassica rapa* *CKX* Gene

Nachdem Ende des Jahres 2011 die gesamte genomische Sequenz von *Brassica rapa* veröffentlicht worden war (Wang *et al.* 2011), wurde *in silico* ermittelt, welche *CKX*-Sequenzen in dem Genom vorhanden sind (

Tabelle 14). Dabei stellte sich heraus, dass nur die Orthologe zu *AtCKX4*, *AtCKX5* und *AtCKX6* in einfacher Kopie im Genom vorliegen. Von *AtCKX2*, *AtCKX3* und *AtCKX7* sind jeweils zwei Orthologe vorhanden, während von *AtCKX1* drei Kopien existieren. Aufgrund der engen Verwandtschaft von *B. rapa* und *B. oleracea* ist wahrscheinlich, dass das *B. oleracea* über die gleiche Kopienzahl der jeweiligen *CKX* Gene verfügt. Entsprechend seiner allotetraploiden Natur müssten im *B. napus* Genom doppelt so viele *CKX*-Kopien vorliegen. Diese Vermutungen können aber erst dann bestätigt werden, wenn die Genomsequenzen beider Arten bekannt sind.

**Tabelle 14** *Brassica rapa* und *Arabidopsis thaliana* CKX Gene im Vergleich. Quelle: brassicadb.org

<i>CKX Gen Arabidopsis thaliana</i>	<i>CKX-Ortholog Brassica rapa</i>
<i>CKX1</i> , AT2G41510	Bra016928
	Bra004626
	Bra000229
<i>CKX2</i> , AT2G19500	Bra040677
	Bra036719
<i>CKX3</i> , AT5G56970	Bra002777 (A1-Kopie)
	Bra035640 (A2-Kopie)
<i>CKX4</i> , AT4G29740	Bra024135
<i>CKX5</i> , AT1G75450	Bra015842
<i>CKX6</i> , AT3G63440	Bra007743
<i>CKX7</i> , AT5G21482	Bra020157
	Bra002371

### 3.3.4 Die *CKX3* und *CKX5* Gene von *Brassica napus*

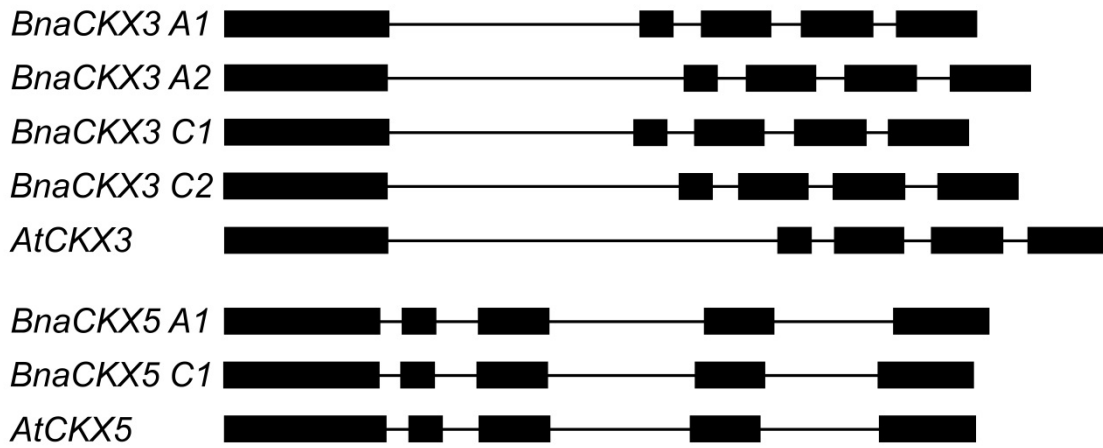
Die vollständige genomische Sequenz von *Brassica napus* ist bislang nicht publiziert worden. Die Firma Bayer CropScience AG hat uns im Frühjahr 2012 aber Sequenzen der *CKX3* und *CKX5* Gene überlassen, die aus ihrem eigenen Raps-Sequenzierungsprojekt stammen. Wie aufgrund der *B. rapa*-Sequenzen erwartet (Wang *et al.* 2011) gibt es in *B. napus* vier *CKX3*- und zwei *CKX5*-Kopien, zu gleichen Teilen aus dem *B. rapa* und dem *B. oleracea* Genom stammend. Ein Vergleich mit den *Arabidopsis* *CKX*-Sequenzen zeigte, dass sich die Längen der unterschiedlichen Genabschnitte im Laufe der Evolution verändert haben (Tabelle 15). Die *CKX3* Gene aus Raps waren 296 – 511 bp kürzer als das *Arabidopsis*ortholog. Dies ist in erster Linie auf eine Verkürzung der Introns zurückzuführen, da die Raps-Proteinsequenzen kaum kürzer waren als die von *Arabidopsis*. Die beiden *BnaCKX5*-Kopien waren auf Proteinebene um 9 Aminosäuren kürzer als das *Arabidopsis*ortholog, die Länge der DNA-Sequenz war aber wenig verändert (+ 46 bp oder – 13 bp).



**Tabelle 15** Gen-, cDNA- und Proteinlänge der *CKX3* und *CKX5* Gene von *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana*. Die *B. napus*-Sequenzen wurden uns von der Bayer CropScience AG zur Verfügung gestellt.

Gen	Gen [bp]	cDNA [bp]	Protein [aa]
<i>BnaCKX3 A1</i>	2811	1575	525
<i>BnaCKX3 A2</i>	3006	1569	523
<i>BnaCKX3 C1</i>	2791	1575	525
<i>BnaCKX3 C2</i>	2979	1572	524
<i>AtCKX3</i>	3302	1572	524
<i>BnaCKX5 A1</i>	2863	1596	532
<i>BnaCKX5 C1</i>	2804	1596	532
<i>AtCKX5</i>	2817	1623	541

Die Exon/Intron-Struktur der Brassicagene ist im Vergleich zu *Arabidopsis* gleich geblieben (Abbildung 29). Sowohl die *CKX3* als auch die *CKX5* Gene teilten sich in je vier Introns und fünf Exons auf, wobei die Länge und Aufteilung der unterschiedlichen Abschnitte innerhalb der Gengruppen ähnlich waren. Es fällt auf, dass die *BnaCKX3 A1*- und *C1*-Kopien untereinander ähnlicher sind als jeweils zu den *A2*- und *C2*-Kopien. Dies wird auch im direkten Sequenzvergleich deutlich (Tabelle 16). Die *BnaCKX3 A1*- und *C1*-Kopien sind in Bezug auf die kodierenden Sequenzen zu 98,6 % identisch, *BnaCKX3 A2* und *C2* zu 97,9 %. Dagegen sind sich *BnaCKX3 A1* und *A2* nur zu 90,1 % ähnlich, *C1* und *C2* zu 89,2 %. Das entspricht in etwa der Sequenzidentität jedes untersuchten *Brassica CKX* Gens mit dem jeweiligen *Arabidopsis* Gen (87,5 – 88,8 %). Die kodierenden Bereiche von *BnaCKX5 A1* und *C1* stimmen zu 98,3 % überein. Der Vergleich der Intron- und Proteinsequenzen ergibt ein ähnliches Bild, wobei sich die Intronsequenzen insgesamt deutlich weniger ähneln als die kodierenden Sequenzen (46,1 % - 95,9 % Sequenzidentität, je nach Vergleich).



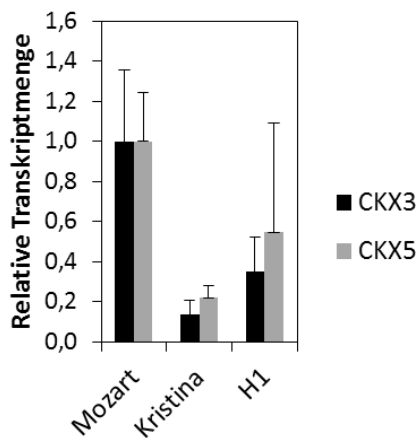
**Abbildung 29** Schematische Darstellung der *CKX3* und *CKX5* Gene aus *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana*. Schwarzer Kasten = Exon, schwarze Linie = Intron.

**Tabelle 16** Sequenzvergleiche der verschiedenen *CKX3*- und *CKX5*-Kopien von *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana*. Die Sequenzidentität (SeqId) beschreibt den Anteil der Übereinstimmung zwischen zwei Basen- oder Aminosäuresequenzen. Die Sequenzähnlichkeit (SeqÄhnl) bezieht beim Vergleich von Proteinsequenzen Aminosäuren ähnlicher Eigenschaften mit ein. Die Analyse wurde mit dem Programm AlignX (VectorNTI Suite, s. Abschnitt 2.1.1) durchgeführt.

Vergleich der Sequenzen von	SeqId Exons [%]	SeqId Introns [%]	SeqId Proteine [%]	SeqÄhnl Proteine [%]
<i>BnaCKX3 A1 / C1</i>	98,6	95,9	98,3	98,7
<i>BnaCKX3 A2 / C2</i>	97,9	92,0	96,4	97,9
<i>BnaCKX3 A1 / A2</i>	90,1	57,5	88,3	93,1
<i>BnaCKX3 C1 / C2</i>	89,2	55,7	87,4	92,2
<i>AtCKX3 / BnaCKX3 A1</i>	88,1	50,1	85,5	92,2
<i>AtCKX3 / BnaCKX3 A2</i>	88,8	48,2	84,5	90,1
<i>AtCKX3 / BnaCKX3 C1</i>	87,5	46,1	84,8	91,8
<i>AtCKX3 / BnaCKX3 C2</i>	88,4	50,7	83,4	89,3
<i>BnaCKX5 A1 / C1</i>	98,3	93,3	97,9	98,3
<i>AtCKX5 / BnaCKX5 A1</i>	88,0	61,3	92,6	95,2
<i>AtCKX5 / BnaCKX5 C1</i>	88,0	58,7	91,5	94,5

### 3.3.5 Die Expression von *CKX3* und *CKX5* in verschiedenen Rapsorten

Wie in der Einleitung beschrieben, zeigten Ashikari und Kollegen (2005), dass in ertragsstarken Reissorten das *CKX2* Gen defekt ist und dass dieser Defekt größtenteils für die guten Erträge der jeweiligen Sorte verantwortlich ist. Das bedeutet, dass im Verlauf der Züchtungsgeschichte mit der Selektion ertragsstarker Pflanzen indirekt gegen ein funktionelles *CKX2* Gen selektiert worden war. Es ist denkbar, dass Ähnliches auch in der zweitausendjährigen Geschichte der Rapszüchtung geschehen ist. Um herauszufinden, ob *CKX3* und/oder *CKX5* in verschiedenen Rapsorten unterschiedlich exprimiert werden, wurde die Expressionsstärke dieser Gene per qRT-PCR in den Sorten Mozart, Kristina und H1 (s. Abschnitt 2.1.7) untersucht (Abbildung 30). Von den drei Sorten ist Mozart die ertragsstärkste. Kristina ist eine ältere Sorte, die weniger Ertrag bringt. Bei H1 handelt es sich um eine doppelt haploide Linie aus dem ehemaligen Labor von Prof. Schieder (FU Berlin), die nicht auf Ertrag gezüchtet worden ist. Es zeigte sich, dass in den Sprossapices der verschiedenen Rapsorten unterschiedliche Mengen von *CKX3* und *CKX5* mRNA vorhanden waren. Für die Auswertung wurden die Transkriptmengen beider Gene für die Sorte Mozart auf 100 % festgelegt (*CKX3*  $100 \pm 36$  % und *CKX5*  $100 \pm 24$  %). Im Vergleich dazu lagen bei der Sorte Kristina nur  $14 \pm 7$  % *CKX3* und  $18 \pm 6$  % *CKX5* Transkript vor, bei der Sorte H1 waren es  $35 \pm 17$  % bzw.  $55 \pm 54$  %.



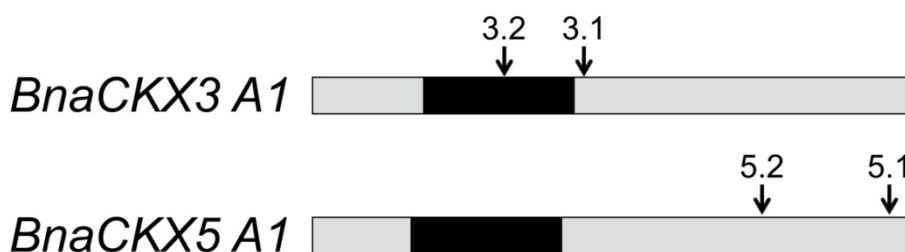
**Abbildung 30** Transkriptmenge von *CKX3* und *CKX5* in den Sprossapices verschiedener Rapsorten. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Jeweils fünf Infloreszenzen (Sprossapex geerntet beim Sichtbarwerden der ersten Knospe, gekürzt auf 1 cm Länge) wurden in einer Probe vereinigt. Die Grafik zeigt den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten. Als Bezugsprobe wurde Mozart gewählt (Relative Transkriptmenge = 1).

### 3.3.6 Klonierung und Transformation der *antiCKX* amiRNA-Konstrukte

Um in Raps möglichst alle *CKX3* und *CKX5* Genkopien gleichzeitig abzuregulieren, wurde eine amiRNA-Strategie (Alvarez *et al.* 2006; Schwab *et al.* 2006) gewählt. Basierend auf den im Rahmen der Arbeit klonierten *Brassica CKX* cDNA-Sequenzen (Tabelle 13) wurden mit Hilfe des *WMD2*

Programms (Schwab *et al.* 2006; Ossowski *et al.* 2008) vier künstliche microRNA Sequenzen (artificial microRNA, amiRNA) entworfen, je zwei gegen *CKX3* und zwei gegen *CKX5*. miRNAs sind RNA-Fragmente von 21 bp Länge, die Bestandteil des Argonaut-Proteinkomplexes sind (Bartel 2004). Durch komplementäre Basenpaarung erkennen miRNAs ihre Zieltranskripte. Nach der Bindung an die mRNA schneidet der Argonautkomplex die gebundene mRNA zwischen den Basen 10 und 11 (vom 5'-Ende der miRNA aus gezählt). Die entstandenen mRNA-Fragmente sind durch den Schnitt an einem Ende ungeschützt und werden abgebaut. Die miRNA bleibt während des Vorgangs erhalten und kann für den Abbau weiterer Ziel-mRNAs sorgen.

Es ist möglich, für fast jedes Gen künstliche miRNAs zu entwerfen. Diese wirken im Zielorganismus nach dem gleichen Prinzip wie die endogenen miRNAs. Beim Design von amiRNAs ist zu beachten, dass sie den natürlichen miRNAs in drei Kriterien ähneln sollten (Schwab *et al.* 2006): Sie sollten mit einem Uracil beginnen, an Position 10 (vom 5'-Ende der amiRNA gezählt) ein Adenin oder ein Uracil haben und an ihrem 5'-Ende nur instabil an die Ziel-mRNA binden, was entweder durch viele A/T Paarungen oder durch eine gezielte Fehlpaarung erreicht werden kann. Weiterhin wird empfohlen, dass sich an den Positionen 2 – 12 maximal eine, besser aber keine Fehlpaarung befinden sollte. Am 3'-Ende der amiRNA sind ein bis zwei Fehlpaarungen von Vorteil. Die absolute Hybridisierungsenergie sollte zwischen -35 kcal/mol und -38 kcal/mol und definitiv nicht niedriger als -30 kcal/mol sein. Prinzipiell spielt es keine Rolle für die Effizienz der amiRNA, an welche Stelle innerhalb der mRNA sie bindet. Die meisten endogenen miRNAs visieren jedoch Ziele nahe des 3'-Endes der mRNA an, z.T. sogar innerhalb der 3'-UTR (Ossowski *et al.* 2012, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 31** Darstellung der amiRNA-Bindungsstellen in den *CKX3* und *CKX5* Genen von *B. napus*. Abgebildet sind mRNA-Modelle von *CKX3 A1* und *CKX5 A1* aus Raps (nicht Maßstabgetreu). Der Bereich, der für die FAD-Domäne kodiert, ist schwarz markiert. Die Pfeile zeigen auf die jeweilige amiRNA-Zielsequenz.

Die Vorhersage über die Effizienz einer amiRNA ist nie vollständig belastbar. So kann es sein, dass eine alle Kriterien erfüllende amiRNA nicht oder kaum in der Lage ist, die Degradation ihrer Ziel-mRNA zu bewirken, während eine andere, nicht optimal designte amiRNA sehr effektiv kann. Deshalb sollten für die Abregulation eines Gens stets zwei parallele amiRNA-Strategien verfolgt werden. Für dieses Projekt wurden daher je zwei amiRNAs gegen *CKX3* und *CKX5* generiert. Sie wurden so gewählt, dass sie alle zum Zeitpunkt der Klonierung bekannten *Brassica CKX3*- und *CKX5*-

Sequenzen (Tabelle 13) degradieren konnten. Sie binden mittig (*CKX3*) oder in Nähe des 3'-Endes (*CKX5*) der Zielsequenzen (Abbildung 31).

**Tabelle 17** Liste der amiRNAs und ihrer Zielsequenzen, sowie der von WMD2 errechneten Hybridisierungsenergien.

Die amiRNA-Sequenzen sind in 3'-5' Orientierung dargestellt, so dass die Basenpaarungen mit den 5'-3' orientierten Zielsequenzen direkt ablesbar sind. Fehlpaarungen sind rot markiert. Die Position 1 der amiRNA entspricht der letzten Base am 5' Ende. Die grau unterlegten Basen entsprechen Position 10, hinter der der Argonautkomplex die Ziel-mRNA zerschneidet.

Die Hybridisierungsenergie  $\Delta G$  wurde mit dem WMD2 Hybridization Tool für eine Temperatur von 19°C berechnet.

Die Vorhersage der Degradationseffizienz einer amiRNA beruht auf den drei von Schwab *et al.* (2006) postulierten Kriterien, die für die Effizienz einer amiRNA entscheidend sein können (s. Text). +++ = alle Kriterien erfüllt, sehr hohe Effizienz erwartet; ++ = zwei der drei Kriterien erfüllt, hohe Effizienz erwartet (in allen sieben Fällen liegt die Hybridisierungsenergie nicht im optimalen Bereich zwischen 35 kcal/mol und 38 kcal/mol, aber immer noch über dem kritischen Schwellenwert von 30 kcal/mol); + = ein Kriterium erfüllt, niedrige Effizienz erwartet; - = Hybridisierungsenergie unter 30 kcal/mol, keine Funktion erwartet.

amiRNA / Zielgen	DNA Sequenz	Position der Fehlpaarung	$\Delta G$ [kcal/mol]	Effizienzvorhersage
<i>amiRNA 3.1</i>	3' ctcggtcataat <u>tt</u> gagcttt 5'			
<i>BnaCKX3 A1</i>	5' gagcaagaatc <u>aa</u> actcgaat 3'	1, 11, 14, 17	-24,53	-
<i>BnaCKX3 A2</i>	5' gagcaagaatc <u>aa</u> actcgaat 3'	1, 11, 14, 17	-24,53	-
<i>BnaCKX3 C1</i>	5' gagccaggatt <u>aa</u> actcgaat 3'	1, 14	-36,53	+++
<i>BnaCKX3 C2</i>	5' gagccaggatt <u>aa</u> actcgaat 3'	1, 14	-36,53	+++
<i>amiRNA 3.2</i>	3' gctgcctgataaacataaatt 5'			
<i>BnaCKX3 A1</i>	5' ggacgga <u>tt</u> tttgtatttaa 3'	14, 21	-35,7	+++
<i>BnaCKX3 A2</i>	5' ggacgga <u>tt</u> tttgcatttaa 3'	7, 14, 21	-30,27	+
<i>BnaCKX3 C1</i>	5' ggacggactattt <u>tt</u> gtatttaa 3'	21	-38,44	++
<i>BnaCKX3 C2</i>	5' ggacggactattt <u>tt</u> gtatttaa 3'	21	-38,44	++
<i>amiRNA 5.1</i>	3' gagcgatggccagtcttttat 5'			
<i>BnaCKX5 A1</i>	5' ctcgctaccggtcagaaaat <u>c</u> 3'	1	-45,02	++
<i>BnaCKX5 C1</i>	5' ctcgctaccggtcagaaaat <u>c</u> 3'	1	-45,02	++
<i>amiRNA 5.2</i>	3' gtcccgtaaaa <u>at</u> cccttattt 5'			
<i>BnaCKX5 A1</i>	5' aagggcatttt <u>g</u> gggaataaa 3'	21	-40,56	++
<i>BnaCKX5 C1</i>	5' aagggcatttt <u>g</u> gggaataaa 3'	10, 21	-40,33	+

Nachdem uns die Sequenzen der *BnaCKX3* und *BnaCKX5* Gene bekannt gegeben worden waren, stellte sich heraus, dass nicht alle amiRNAs der Vorhersage entsprechend an ihre Ziel-mRNA binden (Tabelle 17). So gibt es zwischen den *amiRNAs* 3.1 und 3.2 und den *BnaCKX3* A1- und A2-mRNAs ein bis drei Fehlpaarungen mehr als vorgesehen, allerdings nie mehr als eine in dem kritischen Bereich zwischen den Basen 2 – 12. Zwischen der *amiRNA* 5.2 und der *BnaCKX5* C1 mRNA gibt es eine zusätzliche Fehlpaarung. Die durch die zusätzlichen Fehlpaarungen veränderten Bindungseigenschaften zwischen amiRNA und mRNA beeinflussen die Hybridisierungsenergie, die umso kleiner wird, je mehr Fehlpaarungen in einem RNA-Duplex vorhanden sind. So beträgt z.B. die Hybridisierungsenergie zwischen *amiRNA* 3.1 und *BnaCKX3* A1 bzw. A2 -24,53 kcal/mol anstatt der beim Design vorgesehenen -36,53 kcal/mol. Da laut Schwab *et al.* (2006) die Hybridisierungsenergie einer funktionsfähigen amiRNA nicht unter -30 kcal/mol liegen sollte, ist anzunehmen, dass *amiRNA* 3.1 nicht in der Lage ist, die Degradierung der *BnaCKX3* A1 bzw. A2-mRNAs zu bewirken. Die Hybridisierungsenergien aller anderen amiRNA/mRNA Duplices liegen über dem kritischen Wert von -30 kcal/mol, teilweise aber nicht im optimalen Bereich von -35 bis -38 kcal/mol. Trotz dieser Unzulänglichkeiten ist es möglich, dass die hier verwendeten amiRNAs den Großteil ihrer Ziele erkennen können, allerdings könnte die Degradationseffizienz bei den weniger gut passenden mRNAs niedriger sein als bei den optimal designten Zieltranskripten.

Um eine gleichzeitige Abregulation von *BnaCKX3* und *BnaCKX5* zu erreichen, wurden immer zwei amiRNAs, je eine gegen *CKX3* und eine gegen *CKX5*, hinter den konstitutiv aktiven CaMV 35S Promotor kloniert (Abbildung 32, genauere Angaben zur Klonierung s. Abschnitt 2.3.5.3). Es wurden alle vier möglichen amiRNA-Kombinationen erstellt (Tabelle 18). Die Konstrukte wurden zur Saatunion Biotec GmbH geschickt, die die Hypokotyltransformation und Kallusregeneration der Rapspflanzen (Sorte Mozart) übernahm. Es wurden 27 Primärtransformanten (T<sub>1</sub>-Linien) mit Konstrukt #106 erstellt und ebenso viele Linien mit Konstrukt #107. Die Transformation mit Konstrukt #108 ergab 7 T<sub>1</sub>-Linien, mit Konstrukt #109 wurden 51 T<sub>1</sub>-Linien erzeugt. Parallel zu jedem Transformationsansatz wurden auch nicht-transformierte Hypokotyle in die Regenerationskultur genommen. Die daraus regenerierten Wildtyppflanzen dienten bei der Auswertung der Primärtransformanten als Kontrollen.



**Abbildung 32** Schematische Darstellung der hergestellten amiRNA-Konstrukte (nicht Maßstabgetreu). Hinter einen *CaMV* 35S Promotor wurden die Gene für zwei amiRNA-Precursor (noch nicht prozessierte miRNA-Vorlagen) kloniert, je eine gegen *CKX5* und eine gegen *CKX3*. Alle drei Konstruktabschnitte werden von *att*-Sequenzen des Gateway<sup>TM</sup>-Systems flankiert (schraffiert).

**Tabelle 18** Liste der erstellten amiRNA-Konstrukte und der regenerierten Primärtransformanten (T<sub>1</sub>-Pflanzen). Parallel zu den transformierten Pflanzen wurden Kontrollpflanzen aus nicht-transformierten Hypokotylen erzeugt.

<b>Konstrukt</b>	<b>Nummer</b>	<b>Anzahl T<sub>1</sub>-Pflanzen</b>	<b>Regenerierte Wildtyppflanzen</b>
p35S:ami5.1:ami3.1	#106	27	2
p35S:ami5.1:ami3.2	#107	27	4
p35S:ami5.2:ami3.1	#108	7	2
p35S:ami5.2:ami3.2	#109	51	8

### 3.3.7 Ertragsparameter der Raps-Primärtransformanten

Nachdem die in der Saaten-Union hergestellten Primärtransformanten abgereift waren, wurden von Mitarbeitern der NPZ verschiedene Ertragsparameter gemessen. Die Pflanzen waren in ihrer Leistung sehr unterschiedlich, was unter anderem auf die jeweiligen Insertionsorte der T-DNAs und damit einhergehende Unterschiede bei der Expression des Transgens zurückzuführen sein könnte. Die Ergebnisse der jeweils interessantesten Primärtransformanten sind in Tabelle 19 dargestellt. Die Primärtransformanten setzten mehr Samen an als die jeweiligen Kontrollpflanzen, z.B. bildeten die Pflanzen mit Konstrukt #108 bis zu 6 g mehr Saatgut als die Kontrollen. Dies war in erster Linie auf einen verbesserten Schotenansatz zurückzuführen (314 Schoten bei Pflanze #108.60 im Vergleich zu 147 Schoten bei der entsprechenden Kontrolle), z.T. aber auch auf ein größeres Tausendkorngewicht. So betrug das TKG z.B. von Pflanze #106.29 3,73 g, während das der Kontrollpflanze 2,66 g betrug. Da die Pflanzen aus Kalluskulturen regeneriert und mit PPT selektiert wurden, sind diese Ergebnisse trotz der deutlichen Unterschiede zwischen T<sub>1</sub>- und Kontrollpflanzen nur gering belastbar, denn der Regenerationsprozess kann den Phänotyp stark und auf sehr unterschiedliche Weise beeinflussen.

**Tabelle 19** Ertragsparameter der Raps-Primärtransformanten. Gezeigt werden pro Konstrukt jeweils die Ergebnisse der zwei ertragsstärksten Primärtransformanten (= T1-Pflanzen). Die nicht-transgenen Kontrollpflanzen wurden parallel zu den Transformanten aus Hypokotylen regeneriert. TKG = Tausendkorngewicht.

Im Anhang befindet sich eine Liste aller untersuchten T1-Pflanzen (Tabelle 22).

<b>T1-Pflanze</b>	<b>Saatgut [g]</b>	<b>Anzahl Schoten</b>	<b>TKG [g]</b>
#106.5	9,70	287	2,70
#106.29	11,65	229	3,73
Kontrolle #106	8,31	215	2,66
#107.1	6,23	140	4,63
#107.4	8,64	215	3,06
Kontrolle #107	5,36	111	3,26
#108.60	7,80	314	1,90
#108.61	8,77	202	3,06
Kontrolle #108	2,76	147	2,86
#109.69	10,72	241	3,00
#109.112	12,07	275	2,63
Kontrolle #109	8,12	235	2,63

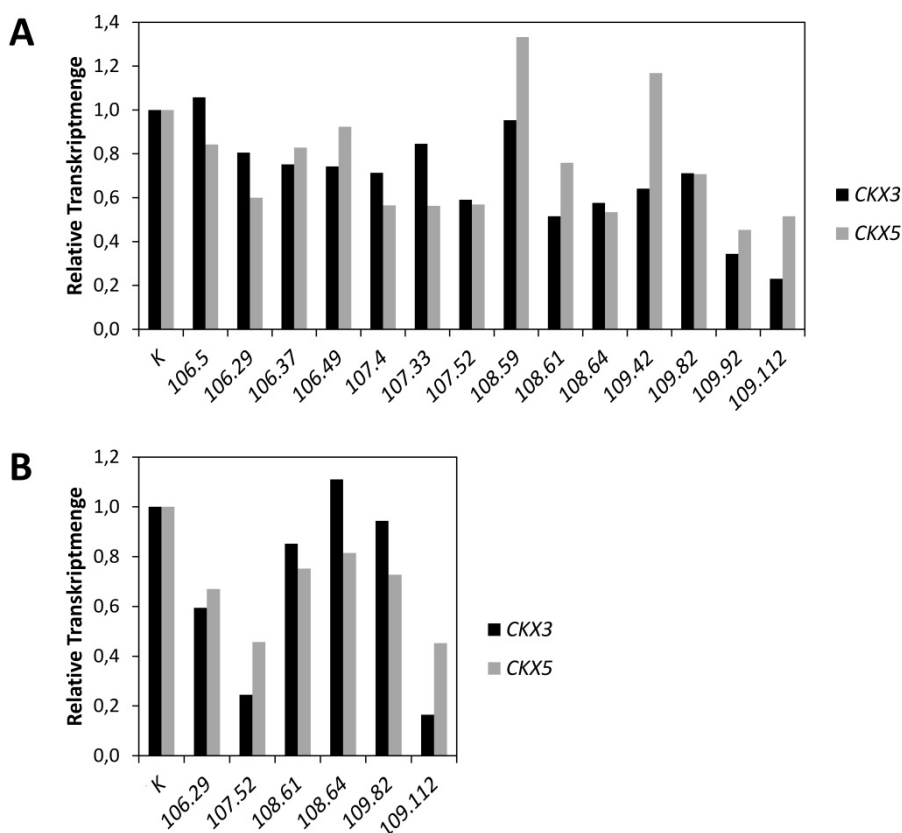
### 3.3.8 Untersuchung der *CKX3*- und *CKX5*-Transkriptmenge in Pflanzen der T<sub>2</sub>- und T<sub>3</sub>-Generation

Um die Funktionalität der amiRNAs zu überprüfen, wurde in der spaltenden T<sub>2</sub>- und der homozygoten T<sub>3</sub>-Generation das Expressionsniveau der *CKX3* und *CKX5* Gene im Sprossapex gemessen. Es wurden 14 T<sub>2</sub>-Linien per qRT-PCR untersucht. Die Expressionswerte (Abbildung 33A) zeigten, dass das mRNA-Niveau in den meisten Linien sowohl für *CKX3* als auch für *CKX5* geringer war als bei der Kontrolle. Die zwei besten Ergebnisse wurden mit dem Konstrukt #109 erzielt. In #109.92 Pflanzen war im Vergleich zur Wildtypkontrolle (Expressionsniveau = 100 %) die relative Menge an *CKX3*-Transkript auf 34 % gesunken, die *CKX5* mRNA war auf 45 % gefallen. In Linie #109.112 wurden bezogen auf den Wildtyp 23 % *CKX3*- und 52 % *CKX5*-Transkript gemessen. Beruhend auf diesen Ergebnissen wurden die sechs Linien mit der stärksten *CKX*-Abregulation (#106.29, #107.72, #108.61, #108.64, #109.82, #109.112) ausgewählt und in die nächste Generation gebracht. Da uns von der Linie #109.92 kein Saatgut zur Verfügung stand, konnte diese trotz vielversprechender qRT-PCR Daten nicht weiter untersucht werden.

Nach der Selektion homozygoter T<sub>3</sub>-Linien wurde erneut das Transkriptniveau von *CKX3* und *CKX5* im SAM gemessen (Abbildung 33B). Die Linie mit der stärksten Abregulation war auch hier wieder #109.112, mit 16,5 % *CKX3* und 45,3 % *CKX5* Expression, bezogen auf 100 % Expression in der



Wildtypprobe. An zweiter Stelle stand Linie #107.52 mit 24,5 % *CKX3* und 45,7 % *CKX5* Expression. Die drittbeste Linie war #106.29, bei der das Expressionsniveau beider Gene bei ca. 60 % lag.



**Abbildung 33** Transkriptmenge von *BnaCKX3* und *BnaCKX5* in den Sprossapices verschiedener amiRNA-Linien. Die mRNA-Menge wurde mittels qRT-PCR gemessen.

(A) mRNA-Level in Basta-selektierten Pflanzen der spaltenden T<sub>2</sub>-Generation. Jeweils zwei Infloreszenzen (Sprossapex geerntet beim Sichtbarwerden der ersten Knospe, gekürzt auf 1 cm Länge) wurden in einer Probe vereinigt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

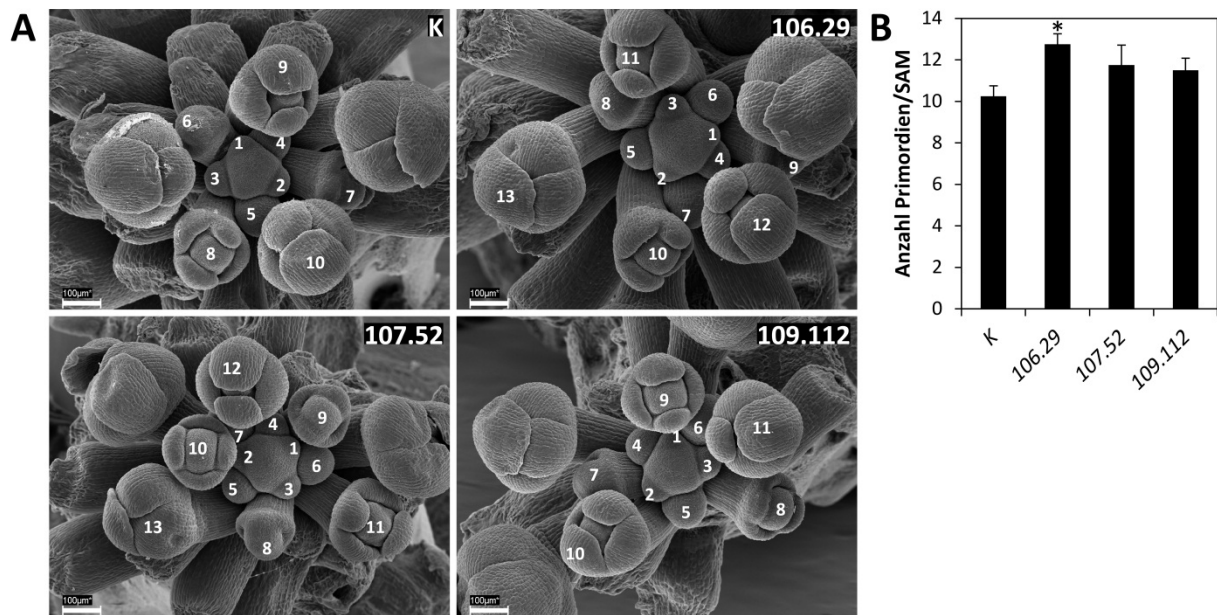
(B) mRNA-Level in unbehandelten homozygoten Pflanzen der T<sub>3</sub>-Generation. Analysiert wurden die Pflanzen, die in der T<sub>2</sub>-Generation die stärkste Abregulation gezeigt hatten. Jeweils zwei Infloreszenzen (Sprossapex geerntet beim Sichtbarwerden der ersten Knospe, gekürzt auf 1 cm Länge) wurden in einer Probe vereinigt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt, mit ähnlichen Ergebnissen.

K = Wildtyp Kontrolle

### 3.3.9 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Raps-Infloreszenzmeristemen

Um nachzuprüfen, ob die Abregulation der *CKX3* und *CKX5* Transkripte im SAM sichtbare phänotypische Folgen hatte, wurden die Infloreszenzmeristeme von den drei Linien, die in der T<sub>3</sub>-Generation die stärkste Abregulation beider Transkripte gezeigt hatten, im Elektronenmikroskop untersucht (Abbildung 34A). Es wurde erhöhte Anzahl von Blütenprimordien zwischen den Stadien 2 und 6 (nach Smyth *et al.* Smyth *et al.* 1990) pro SAM registriert (Abbildung 34B). Smyth und Kollegen bezogen sich in ihrer Beschreibung der Blütenentwicklung auf Arabidopsis. Aufgrund der

Uniformität des Blütenaufbaus innerhalb der Brassicaceae wurde hier Smyths Einteilung der verschiedenen Arabidopsisstadien für Raps übernommen. Stadium 2 beginnt, wenn sich das Blütenprimordium sichtbar vom SAM abtrennt. In Stadium 6 umschließen die Kelchblätter die Blüte vollständig. In den vier Meristemen der nicht-transgenen Kontrollpflanzen wurden im Durchschnitt  $10,25 \pm 0,5$  Primordien gezählt, für Linie #106.29 waren es  $12,75 \pm 0,5$ . Die anderen beiden Linien waren mit durchschnittlich  $11,8 \pm 1$  und  $11,5 \pm 0,6$  Primordien etwas weniger produktiv. Dies zeigt, dass die erfolgreiche Abregulation von *CKX3* und *CKX5* in den Brassicapflanzen zu einer gesteigerten SAM-Aktivität führt, so wie es auch in Arabidopsis der Fall ist.



**Abbildung 34** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Raps-Infloreszenzmeristeme.

(A) REM-Aufnahmen von Infloreszenzmeristemen homozygoter amiRNA-Linien. Die Blütenknospen sind nummeriert vom ersten Primordium des Stadiums 2 bis zum ersten Primordium des Stadiums 6 (nach Smyth *et al.* 1990). Maßstab = 100  $\mu$ m

(B) Anzahl der gebildeten Primordien (Stadien 2 - 6) pro SAM, beruhend auf den REM-Aufnahmen. K = Wildtyp Kontrolle, n = 4, [t-Test]: \* = p < 0,01

### 3.3.10 Erfassung verschiedener Ertragsparameter und Sprossmerkmale

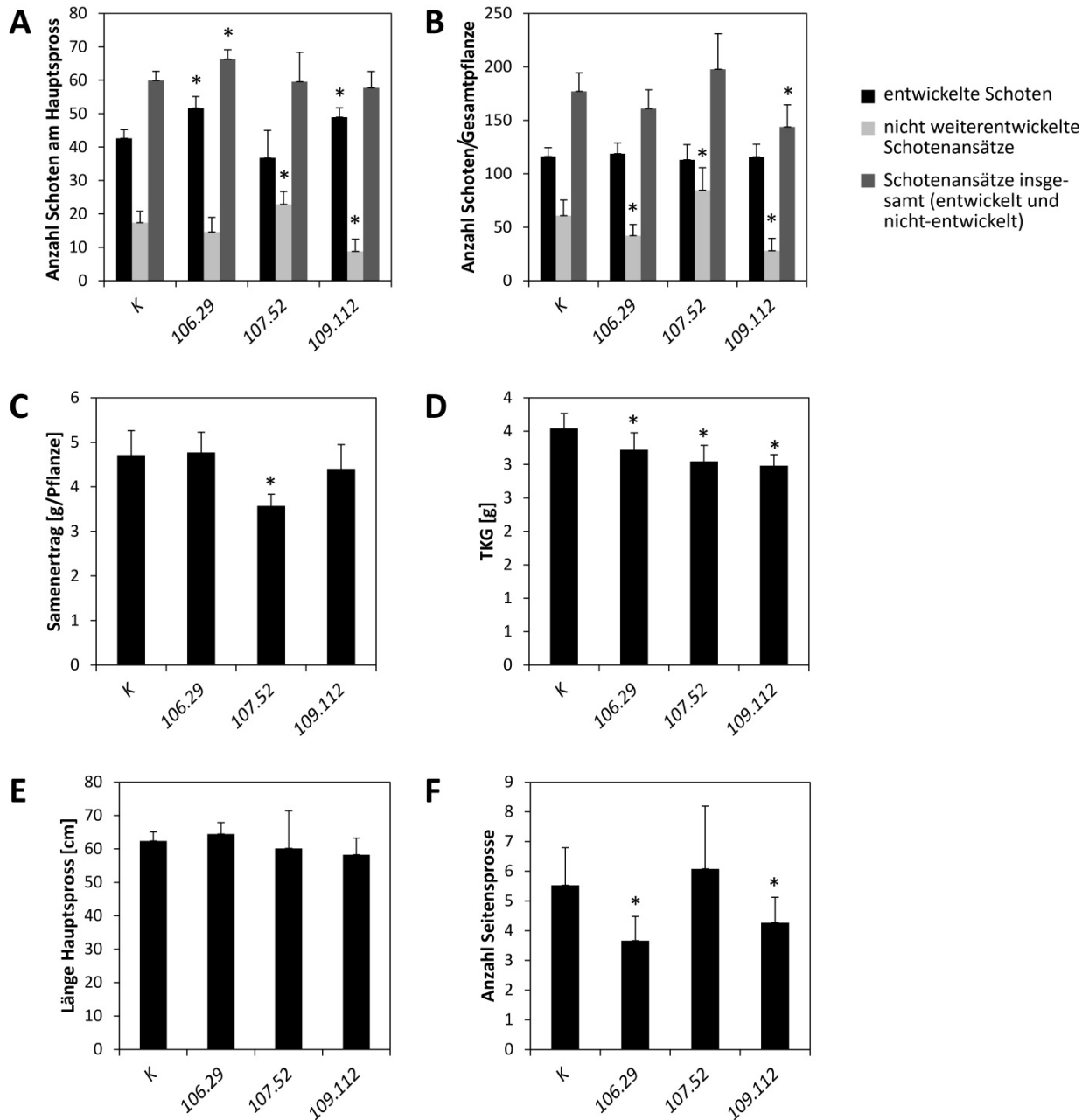
Als nächstes wurde untersucht, ob die erhöhte Aktivität des SAM sich auf den Ertrag der transgenen Rapspflanzen auswirkt. Die durch diesen Versuch gewonnenen Ergebnisse sind allerdings nur gering belastbar. Insgesamt wurde das Experiment dreimal durchgeführt, doch nur der dritte Durchlauf war tatsächlich auswertbar. Bei den anderen beiden Durchläufen waren von allen Pflanzen hauptsächlich taube Schoten gebildet worden, die winzige tote Samen enthielten. Die tauben Schoten sahen von außen normal entwickelt aus und waren nicht von normal gefüllten Schoten zu unterscheiden. Derlei

wurde auch beim dritten Versuchsdurchgang beobachtet, allerdings in geringerem Ausmaß, so dass eine Auswertung unter Vorbehalt möglich war.

Die Linie #106.29 bildete am Hauptspross mit  $51,7 \pm 3,4$  tatsächlich signifikant mehr Schoten als der Wildtyp mit  $42,6 \pm 2,6$  (Abbildung 35A). Trotzdem bildeten die #106.29 Pflanzen insgesamt nicht mehr Schoten als der Wildtyp (Abbildung 35B), so dass der Gesamtertrag von  $4,7 \pm 0,5$  g (Kontrolle) nicht gesteigert werden konnte, sondern gleich blieb ( $4,8 \pm 0,5$  g, Abbildung 35C). Das Tausendkorngewicht (TKG, Abbildung 35D) war mit  $3,2 \pm 0,3$  g sogar kleiner als bei den Kontrollen ( $3,5 \pm 0,2$  g). Die Erträge der anderen beiden Linien waren deutlich geringer. Obwohl sie insgesamt gleichviele Schoten wie die zuvor beschriebenen Linien entwickelten und Linie #109.112 mit  $48,9 \pm 2,8$  Stück sogar mehr Schoten am Hauptspross trug als die Kontrollpflanzen, war der Gesamtertrag vergleichsweise klein. Linie #107.52 erbrachte  $3,6 \pm 0,3$  g, Linie #109.112 mit  $4,4 \pm 0,5$  g etwas mehr. Bei Linie #107.52 fiel außerdem die große Zahl nicht entwickelter Schoten auf (im Schnitt 81 nicht entwickelte Schoten pro Pflanze im Vergleich zu 61 beim Wildtyp). Das TKG lag bei beiden Linien bei  $3,0 \pm 0,2$  g.

Die Länge des Hauptsprosses veränderte sich durch den veränderten Cytokininstatus nicht (Abbildung 35E). Zwei der drei untersuchten Linien entwickelten mit  $3,7 \pm 0,8$  und  $4,3 \pm 0,9$  weniger Verzweigungen als die Kontrollpflanzen, die durchschnittlich  $5,5 \pm 1,3$  Seitensprosse bildete (Abbildung 35F). Dies könnte der Grund für den geringen Ertrag trotz erhöhter Schotenzahl am Hauptspross sein. Ein weiterer Grund ist vermutlich der schlechte Samenansatz; viele Schoten waren nur mit wenigen Samen gefüllt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der leicht vergrößerten Infloreszenzmeristeme kein positiver Effekt auf den Ertrag gemessen werden konnte. Bei zwei der drei transgenen Linien war sogar eine deutlich Verschlechterung zu verzeichnen.



**Abbildung 35** Darstellung verschiedener Ertragsparameter und Sprossmerkmale von transgenen Brassicapflanzen.

(A, B) Entwickelte Schoten mit mindestens einem Samen bzw. Ansatzstellen nicht-entwickelter Schoten (A) am Hauptspross und (B) an der Gesamtpflanze. (C) Samenertrag. (D) Tausendkorngewicht (TKG). (E) Länge des Hauptsprosses. (F) Anzahl der Seitensprosse.

K = Wildtyp Kontrolle, n = 15 (K, 106.29) / n = 12 (107.52) / n = 16 (109.112), [t-Test]: \* = p < 0,01

## 4. Diskussion

Die dynamische Struktur des SAM wird durch das komplexe Zusammenspiel von Pflanzenhormonen und genetischen Regulatoren etabliert und unterhalten. Cytokinin ist eine wichtige Komponente dieses regulatorischen Netzwerks. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des Hormons in funktionell wichtigen Domänen des SAM untersucht. Mit *AHP6* wurde ein Gen erforscht, das direkt an der Cytokininsignaltransduktion im SAM beteiligt ist. Ferner wurde getestet, wie sich die Erhöhung des Cytokininstatus im SAM von Raps auf den Samenertrag auswirkt.

In diesem Kapitel werden die während der Arbeit gesammelten Ergebnisse interpretiert und in den aktuellen Forschungskontext eingeordnet. Da bei einigen der transgenen Linien ein *gain-of-function* Ansatz verfolgt wurde und außerdem viele phänotypische Beobachtungen nicht abschließend untersucht wurden, ist ein großer Teil der hier angebrachten Interpretationen spekulativ.

### 4.1 Untersuchung der *ckx3 cks5 ahp6* Mutante

Die Untersuchung von Pflanzen mit verändertem Cytokininingehalt oder verstärkter Cytokininsensitivität im SAM hatte gezeigt, dass das Hormon eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Meristemgröße übernimmt (Werner *et al.* 2003; Higuchi *et al.* 2004; Nishimura *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2010; Bartrina *et al.* 2011; Chickarmane *et al.* 2012). Um besser zu verstehen, wie Cytokinin die SAM-Größe reguliert, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Meristeme von *ahp6* und *ckx3 cks5 ahp6* Mutanten untersucht. *AHP6* ist ein negativer Regulator der Cytokininsignaltransduktion (Mähönen *et al.* 2006a). In der Vergangenheit wurde beobachtet, dass die Infloreszenzen von *ahp6* Mutanten leicht vergrößert sind (Werner und Bartrina, persönliche Mitteilung). Hier wurde nun durch In-situ-Hybridisierungen (Abbildung 6) gezeigt, dass *AHP6* am Entstehungsort zukünftiger Primordien, den sogenannten Initien (Besnard *et al.* 2011) oder P<sub>0</sub> Positionen, sowie in jungen Primordien im P<sub>1</sub>-Stadium (Beginn einer leichten Wölbung am Meristemrand, nach Smyth *et al.* 1990) aktiv ist (siehe auch Gordon *et al.* 2009). In jungen Primordien wird durch den Wegfall der *STM*-Aktivität (Long und Barton 2000) vermutlich die Transkription von *IPT7* und damit die Cytokininbiosynthese reduziert. Zusätzlich wird durch die Aktivität von *AHP6* wahrscheinlich die Cytokininsignaltransduktion inhibiert. Dadurch wird der Einfluss von Cytokinin, das aus umliegenden Zellen in die Organanlage einströmen kann, unterbunden. Die Initien befinden sich noch innerhalb der PZ und sind durch ein lokales Auxinmaximum definiert. Die Akkumulation des Auxintransportproteins PIN1, die der Bildung des Auxinmaximums vorausgeht, markiert den Beginn der Primordienentwicklung (Heisler *et al.* 2005). Es wurde nicht untersucht, zu welchem Zeitpunkt während der Primordieninitiation *AHP6* angeschaltet wird. Echtzeitaufnahmen von fluoreszenzmarkierten *AHP6* Proteinen im SAM würden diese Frage beantworten. Da das Gen in

einem Bereich mit hoher Auxinkonzentration aktiv ist, ist denkbar, dass *AHP6* durch Auxin reguliert wird und direkt nach der Entstehung des Hormonmaximums angeschaltet wird, um den Fortgang der Primordieninitiation mit zu bestimmen. Gegen diese Hypothese spricht, dass *AHP6* bei Microarray-Untersuchungen bisher nicht als Auxinzielgen identifiziert wurde (Paponov *et al.* 2008; Lee *et al.* 2009b).

Das SAM von *ahp6* Mutanten ist kaum verändert, nur die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine schwache Tendenz zu vergrößerten Meristemen, die aber nicht signifikant war (Abbildung 7). Ein ganz anderer Effekt wurde in *ckx3 ckx5 ahp6* Mutanten beobachtet. Dort verursachte das Hinzukommen der *ahp6* Mutation eine Vergrößerung des SAM, die gemessen an der Primordienbildungsrate fast 40 % betrug. Es stellt sich die Frage, warum der Verlust eines Gens, das außerhalb des Meristems aktiv ist, unter bestimmten Bedingungen eine Vergrößerung der SAM-Größe zur Folge hat.

Um diese Frage zu beantworten, sollte man sich nochmals die Bedeutung sowohl der *ckx3 ckx5* Mutationen als auch der *ahp6* Mutation vor Augen führen. Im Meristem von *ckx3 ckx5* Pflanzen ist das Cytokiningrundniveau allgemein im ganzen SAM und besonders im Meristemzentrum erhöht. Die Erhöhung des Cytokininspiegels bewirkt die gleichzeitige Vergrößerung von SAM und OZ (Bartrina *et al.* 2011). Es ist anzunehmen, dass in diesem Zusammenhang auch die Stammzellendomäne verbreitert ist, was bislang nicht überprüft wurde. Das größere SAM kommt bei *ckx3 ckx5* Mutanten also vermutlich dadurch zustande, dass ein umfangreicheres OZ eine größere Stammzellengruppe unterhält, die mehr Zellen an die PZ abgeben kann. Der PZ stehen somit mehr Zellen zur Organbildung zur Verfügung und die Primordienbildungsrate ist erhöht. Trifft diese Annahme zu, wären also alle Meristemzonen proportional vergrößert.

Anders als die *ckx* Mutationen ruft die *ahp6* Mutation keine Erhöhung des Cytokiningehalts hervor. Der Verlust der *AHP6* Genaktivität führt stattdessen vermutlich dazu, dass die Initien und Primordien cytokininsensitiver sind, weshalb sie empfindlich auf einen Anstieg der umgebenden Cytokininkonzentration reagieren könnten. Im Meristem von *ahp6* Pflanzen existieren wahrscheinlich Mechanismen, die in der Lage sind, die veränderte Cytokininsensitivität der Initien abzuf puffern. Kandidaten für einen solchen Puffermechanismus wären die meristematischen *CKX* Gene, die bei einem Anstieg des Cytokiningehalts schnell heraufreguliert werden könnten, um das Hormon abzubauen, bevor es die Primordieninitiation stören könnte.

In *ckx3 ckx5 ahp6* Pflanzen kommen nun möglicherweise drei Faktoren zusammen: Erstens enthält das Meristem, ganz besonders das OZ, mehr Cytokinin, zweitens sind die Initien cytokininsensitiv, drittens fallen *CKX3* und *CKX5* als Puffer der Cytokininkonzentration aus. Da ein Cytokininsignal im Initium nicht durch *AHP6* verhindert werden kann, und weil zur Kompensation des störenden Cytokininüberschusses *CKX3* und *CKX5* nicht heraufreguliert werden können, könnte es notwendig sein, das Initium in größerer Entfernung zu den cytokininreichen Zellen des SAM-Zentrums zu etablieren. Um dies zu erreichen wäre es ausreichend, den Zellen der PZ mehr Zeit zur Teilung zur

Verfügung zu stellen, sprich, die Primordienbildung verspätet zu initiieren. Dadurch würde sich die PZ vergrößern, Stammzellendomäne und OZ würden aber ihre Größe beibehalten. Damit würden sich, anders als bei der *ckx3 cckx5* Mutante, die Proportionen der einzelnen Domänen zueinander verändern. Um dies zu überprüfen, könnten beispielsweise In-situ-Hybridisierungen mit *WUS*- und *CVL3*-spezifischen RNA-Sonden durchgeführt werden. Weiterhin könnte man das Verhalten von fluoreszenzmarkierten PIN1-Proteinen beobachten, um zu prüfen, ob die Initien sich tatsächlich später etablieren.

In den Blüten von *ckx3 cckx5 ahp6* Mutanten waren die Primordien der Antheren sichtbar, bevor die Kelchblätter das FM vollständig umschlossen (Abbildung 8). In Wildtypblüten sind die Primordien der drei inneren Wirtel von Blütenorganen dagegen niemals sichtbar, da die zuerst gebildeten Kelchblätter das FM so schnell überwachsen, dass die inneren Organe verdeckt entstehen (Smyth *et al.* 1990). Möglicherweise ist die Entwicklung der Kelchblattprimordien bei *ckx3 cckx5 ahp6* Mutanten verlangsamt. Der Grund dafür könnte ein störender Cytokinineinfluss in den jungen Primordien sein, der den Entwicklungsverlauf innerhalb der Organanlage verlangsamen könnte.

Obwohl *ahp6* und *ckx3 cckx5 ahp6* Mutanten weniger Schoten bilden als der Wildtyp, ist *AHP6* als negativer Regulator der Aktivität und Größe des SAM ein potentielles Ziel der Ertragszüchtung. Im Genom von *B. rapa* gibt es eine *AHP6*-Kopie (Wang *et al.* 2011), in *B. napus* existieren dementsprechend zwei (unveröffentlichte Daten). Die Untersuchung von Knockoutmutanten oder amiRNA-Linien könnten erste Schritte sein, um die Relevanz von *AHP6* für die Züchtung zu testen.

## 4.2 Die Veränderung des Cytokininstatus in der *CLV3*-Domäne

Obwohl über die Funktion von Cytokinin im Sprossmeristem bereits einiges bekannt ist, weiß man wenig über die Rolle des Hormons direkt in den Stammzellen. Da cytokininaktivierende *LOG4*- und möglicherweise auch *LOG7*-Enzyme in der *CLV3*-Domäne aktiv sind (Aggarwal *et al.* 2010; Chickarmane *et al.* 2012), ist davon auszugehen, dass Cytokinin in den Stammzellen vorhanden ist. Der Nachweis verschiedener Cytokininsignaltransduktionskomponenten spricht außerdem für eine Funktion von Cytokinin in der Region. So war in einer GUS-Reporteranalyse die Aktivität des *AHK3* Promotors in diesem Bereich gezeigt worden (Mähönen *et al.* 2006b). Ferner wurde in den Stammzellen anhand von In-situ-Hybridisierungen bzw. GUS-Färbungen die Transkription verschiedener A-Typ *ARRs*, die direkte Antwortgene der Cytokininsignaltransduktion sind, nachgewiesen (*ARR5*, *ARR7* und *ARR15*, Leibfried *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2010). Trotzdem konnte mit dem Cytokininsignalreporter *TCS:GFP* keine Aktivität des Zweikomponentensystems detektiert werden (Gordon *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2011; Zürcher *et al.* 2013). Dies muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass tatsächlich keine Signaltransduktion stattfindet, denn der synthetische *TCS* Promotor funktioniert aufgrund seiner Zusammensetzung in manchen Geweben nicht gut (Bruno Müller, persönliche Mitteilung). Unabhängig von einer möglichen Cytokininfunktion direkt in der

*CLV3*-Domäne zeigte Chickarmane *et al.* (2012) in einem Computermodell, dass Cytokinin, das in den L1-Stammzellen gebildet wird, im Meristemgewebe einen Hormongradienten etablieren könnte, der dazu beitragen könnte, die Position des OZ festzulegen.

#### 4.2.1 Absenkung des Cytokininstatus in der *CLV3*-Domäne

Sowohl die Expression von *pCLV3:CKX1* als auch von *pCLV3:ARR1-SRDX* sollte den Cytokininstatus der Stammzellen spezifisch herabsetzen, einmal durch die Erzeugung eines lokalen Cytokininmangels und einmal durch die Unterdrückung der Signaltransduktion. Obwohl die Transkription beider Transgene per RT-PCR nachgewiesen werden konnte, zeigten die verschiedenen transgenen Pflanzen keinen offensichtlichen Phänotyp. Eine ähnliche Beobachtung machte Holst in ihrer Doktorarbeit (2009), als sie ein *pCLV3:CKX3*-Konstrukt in *Arabidopsis* exprimierte, ohne eine phänotypische Veränderung der Pflanzen zu registrieren. Es ist denkbar, dass die Aktivität des *CLV3* Promotors zu schwach ist, um *CKX1*, *CKX3* bzw. *ARR1-SRDX* so stark zu exprimieren, dass ein spürbarer Cytokininmangel-effekt entsteht. Es wäre daher interessant, einen anderen stammzellenspezifisch aktiven Promotor mit den entsprechenden Genen zu kombinieren und in *Arabidopsis* zu transformieren. Mögliche Kandidaten dafür sind die Promotoren der Gene *APUM-10*, *MCT2* und *LOG7*, die von Aggarwal *et al.* (2010) auf ihre stammzellenspezifische Aktivität getestet wurden.

Da die Stammzellendomäne nur ca. 35 Zellen umfasst (Xie *et al.* 2009), ist denkbar, dass ein gesteigerter Einstrom von Cytokinin aus umliegenden Zellen den verstärkten Hormonabbau durch transgenes *CKX1* oder *CKX3* ausgleichen könnte. Möglich wäre auch, dass in der zentralen Zone aktive LOG bzw. IPT Enzyme ihre Aktivität steigern und dadurch für Ausgleich sorgen. Die Expression von *ARR1-SRDX* umgeht die Wirkung solcher Effekte, da der Suppressor die Signaltransduktion auch bei höheren Cytokininkonzentrationen unterdrücken sollte. Trotzdem unterscheidet sich der Phänotyp der *pCLV3:ARR1-SRDX* transgenen Pflanzen nicht von den *pCLV3:CKX1/CKX3* transgenen Pflanzen.

Das Modell von Chickarmane *et al.* (2012) weckt die Vermutung, dass eine Veränderung des Cytokiningradienten in der *CLV3*-Domäne, wie sie durch die *pCLV3:CKX*-Konstrukte hervorgerufen werden sollte, Auswirkungen auf die Positionierung des OZ haben könnte. Phänotypische Veränderungen, die auf einen derartigen Vorgang rückschließen lassen, wurden jedoch nicht beobachtet. Eine genauere Untersuchung des SAM durch anatomische Schnitte könnte Aufschluss bringen, ob die Meristemorganisation in den transgenen Pflanzen wenigstens geringfügig verändert ist. Eine andere Erklärung für das Ausbleiben eines Phänotyps könnte sein, dass trotz der Anwesenheit von Cytokininsignaltransduktionskomponenten das Signal in den Stammzellen von so geringer Bedeutung ist, dass ein Herabsetzen des Cytokininstatus kaum Wirkung zeigt. Weiterhin ist denkbar, dass die Wirkung des Hormons in den Stammzellen stark gepuffert ist. Chickarmane *et al.* (2012)



zeigten mit ihren Analysen, dass das CLAVATA-System ausgleichend auf die Wirkung von Cytokinin im SAM wirkt. So führte die Applikation von Cytokinin auf das SAM von Wildtyppflanzen nur zu einer 1,5-fachen Vergrößerung desselben, während die gleiche Behandlung bei *clv3* Mutanten zu einer 15-fachen Vergrößerung des SAM führte. Es ist denkbar, dass umgekehrt eine Absenkung des Cytokininstatus ebenfalls bis zu einem gewissen Grad durch das CLAVATA-System gepuffert ist. Um dies zu untersuchen, könnte man *pCLV3:CKX* bzw. *pCLV3:ARR1-SRDX* transgene Pflanzen mit *clv3* Mutanten kreuzen und die Hybriden untersuchen (Dominique Sturm, Masterarbeit, unveröffentlicht).

#### 4.2.2 Erhöhung des Cytokininstatus in der *CLV3*-Domäne

Die Erzeugung eines konstitutiven Cytokininsignals in den Stammzellen durch das *pCLV3:ROCK2* Transgen rief pleiotrope Veränderungen des Phänotyps hervor (Abbildung 13B). Im Vergleich zum Wildtyp waren transgene Pflanzen kaum verzweigt, sie bildeten Rosetten mit weniger Blättern, bis zu 68 % dickere Sprossachsen, abnormale Blüten und extrem vergrößerte Sprossmeristeme. Verschiedene Aspekte dieses Phänotyps sind bereits aus der Literatur bekannt, jedoch wurden noch keine Pflanzen beschrieben, die den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen phänotypisch vollständig gleich sind. Die Pflanzen, die größere Ähnlichkeit mit den transgenen Pflanzen aufweisen, werden hier kurz aufgelistet und in den folgenden Abschnitten dann detaillierter beschrieben und diskutiert. Es sind die Mutanten *rev* (*revoluta*), *gor*, *clv1*, *clv2* und *clv3* (Leyser und Furner 1992; Clark *et al.* 1993; Talbert *et al.* 1995; Kayes und Clark 1998; Takano *et al.* 2010), sowie cytokininbehandelte und einige cytokininüberproduzierende Pflanzen (Lindsay *et al.* 2006; Li *et al.* 2010; Marsch-Martínez *et al.* 2012).

Da im Laufe dieses Kapitels mehrfach Vergleiche zur *rev* Mutante hergestellt werden, soll diese hier kurz beschrieben werden. REV ist ein Transkriptionsfaktor (Zhong und Ye 1999), der Funktionen bei der Etablierung lateraler Meristeme (AM und FM) sowie der Leitgewebeentwicklung übernimmt (Talbert *et al.* 1995; Zhong *et al.* 1997; Zhong und Ye 1999; Otsuga *et al.* 2001). Promotor-GUS Analysen und In-situ-Hybridisierungen zeigten, dass *REV* im Embryo, in Leitbündeln, interfaszikularem Gewebe, im SAM und in Blüten exprimiert wird (Zhong und Ye 1999; Otsuga *et al.* 2001). Im SAM wurde *REV* mRNA in der inneren PZ, der CZ und dem obersten Teil der RZ detektiert (Otsuga *et al.* 2001). Weiterhin findet sich Transkript direkt unterhalb von Initien und jungen Primordien (Stadium 1, nach Smyth *et al.* 1990). In weiterentwickelten Blütenprimordien (Stadium 2) wird das Gen an der Stelle des zukünftigen FM exprimiert. Die Genaktivität im FM ist ähnlich wie im SAM. *REV* ist außerdem während der Etablierung lateraler Meristeme aktiv. Transkript findet sich in subepidermalen Zellen an der adaxialen Blattbasis, also dort, wo sich ein axilläres Meristem etablieren wird.

*rev* Mutanten entwickeln einen auffälligen Phänotyp (Talbert *et al.* 1995). Die Pflanzen bilden ledrige, dunkelgrüne Blätter und bringen keine Seitenrosetten bzw. am blühenden Spross kaum

Verzweigungen hervor. Die Sprossachse ist instabil und fällt leicht um, da wenig Lignin gebildet wird. Die Blüten sind entweder vergrößert und fertil, steril und missgebildet oder filiform. Das Infloreszenzmeristem bildet zunächst abwechselnd Blüten aller drei Typen und stellt sein Wachstum schließlich mit der Bildung einer großen Zahl filiformer Blüten frühzeitig ein.

#### **4.2.2.1 Der vegetative Phänotyp von *pCLV3:ROCK2* Pflanzen**

Der Habitus der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen war im Vergleich zum Wildtyp verändert. Besonders auffällig waren die fehlenden Verzweigungen. Während der Wildtyp nach einem Monat acht bis zwölf Seitenrosetten angelegt hatte, war bei den transgenen Pflanzen maximal eine Seitenrosette entwickelt worden, mehr als die Hälfte der Pflanzen hatte gar keine gebildet. Am Spross oberhalb der Rosette wurden keine bis zwei Verzweigungen erster Ordnung gezählt, Verzweigungen zweiter Ordnung wurden nie beobachtet. Dementsprechend selten wurden oberhalb der Rosette Blätter gebildet. Beim Wildtyp wurden dagegen am Hauptspross bis zu sechs Seitensprosse sowohl erster als auch zweiter Ordnung gezählt.

Die geringe Anzahl der Verzweigungen bei den transgenen Pflanzen könnte auf eine verstärkte Apikaldominanz hinweisen. Die Apikaldominanz wird durch Auxin vermittelt, das die Entwicklung von Seitensprossen unterdrückt (Müller und Leyser 2011). Das Hormon wird von den jüngsten Organen an der Sprossspitze gebildet und im Phloem in Richtung Wurzel transportiert. Cytokinin, das im Xylemsaft aus der Wurzel in Richtung Sprossspitze transportiert wird, fördert dagegen das Auswachsen der axillären Meristeme und agiert dadurch antagonistisch zu Auxin (Müller und Leyser 2011). Die vielen Blütenknospen, die von den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen gebildet und am Sprossapex akkumuliert werden, sind vermutlich eine starke Auxinquelle. Als direkte Konsequenz der verstärkten Hormonproduktion am Sprossapex könnte der Auxingehalt im Leitgewebe der Pflanze erhöht sein, was das Auswachsen von Seitensprossen erschweren würde.

Das Auswachsen der axillären Meristeme kann stimuliert werden, indem der Auxinfluss in der Sprossachse durch Abschneiden des Sprossapex unterbrochen wird. Im Laufe dieser Arbeit wurden häufig die Sprossspitzen von *pCLV3:ROCK2* Pflanzen entnommen und gelegentlich wurden die enthaupteten Pflanzen weiter gezogen, um beispielsweise Samen oder noch mehr Meristeme zu erhalten. Dabei wurde beobachtet, dass nach dem Abschneiden nur selten sekundäre Sprosse gebildet wurden. Es ist also möglich, dass nicht die Apikaldominanz verstärkt ist, sondern stattdessen die Anlagen der axillären Meristeme selbst gestört sind.

Wie bei den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen wurde bei den wenig verzweigten Mutanten *las* (*lateral suppressor*), *rax1 – rax3* (*regulators of axillary meristems*) und *rev* (Talbert *et al.* 1995; Greb *et al.* 2003; Keller *et al.* 2006; Müller *et al.* 2006) beobachtet, dass nach einer Dekapitation kaum Seitensprosse auswachsen. In allen genannten Mutanten ist die Bildung axillärer Meristeme entweder in der Rosette oder in der gesamten Pflanze unterbunden. *LAS* und *RAX1 – RAX3*, die für verschiedene

Transkriptionsfaktoren kodieren, werden in der Meristem/Organ-Grenzregion exprimiert, *LAS* auch an der Basis junger Seitentriebe (Greb *et al.* 2003; Keller *et al.* 2006; Müller *et al.* 2006). *REV* wird wie eingangs erwähnt direkt unterhalb junger Primordien exprimiert und gilt zusammen mit *STM* als frühester bekannter Marker von axillären Meristemen (Otsuga *et al.* 2001).

Wie kann es nun sein, dass das *pCLV3:ROCK2* Transgen, das ausschließlich im SAM-Zentrum aktiv sein sollte, einen Verzweigungsphänotyp hervorruft, der normalerweise durch die Mutation von Genen entsteht, die (abgesehen von *REV*) ausschließlich außerhalb des SAM exprimiert werden? Reguliert Cytokinin aus dem SAM-Zentrum heraus die Entstehung von Seitenmeristemen? Oder ist es die abnormale Meristemstruktur der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen, die störend auf die Abläufe während der Primordienbildung am SAM-Rand wirkt? Um erste Hinweise für eine Antwort zu sammeln, könnte durch In-situ-Hybridisierungen die Expression der *LAS*, *RAX* und *REV* Gene in den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen untersucht werden. Es wäre auch interessant, *pCLV3:ROCK2* Pflanzen mit Mutanten zu kreuzen, die sich verstärkt verzweigen, wie z.B. *axr1* (Lincoln *et al.* 1990; Stirnberg *et al.* 1999) oder *avb1*, einer *gain of function* Mutation von *rev* (Zhong und Ye 2004). Dadurch ließe sich herausfinden, ob das Transgen in der Lage ist, die vermehrten Verzweigungen zu unterdrücken.

Die Primärrosetten der transgenen Pflanzen enthielten drei bis vier Blätter weniger als der Wildtyp, außerdem war der Rosettendurchmesser um 20 % - 40 % reduziert. Die geringere Anzahl an Rosettenblättern bei den transgenen Pflanzen kommt vermutlich durch den verfrühten Übergang vom vegetativen zum generativen Stadium zustande. Bei *pCLV3:ROCK2* Pflanzen wurden bereits nach zehn Tagen Blütenprimordien detektiert, was bedeutet, dass die transgenen Pflanzen weniger Zeit zur Verfügung hatten, um Blätter zu bilden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen Pflanzen mit erhöhtem Cytokininingehalt gemacht, zum Beispiel bei *ckx*-Sechsfachmutanten und *rock2* bzw. *pAHK2:ROCK2* Pflanzen (Bartrina, persönliche Mitteilung; Braun, unveröffentlicht). In Wildtyppflanzen geht der Wechsel von der vegetativen zur generativen Lebensphase mit einem Anstieg der Cytokininkonzentration im SAM einher (Corbesier *et al.* 2003). Durch das *pCLV3:ROCK2* Transgen entsteht im SAM ein verstärktes Cytokininsignal, das den Lebensphasenwechsel möglicherweise verfrüht induziert.

Die Blätter der transgenen Pflanzen waren von einem sehr dunklen Grün, fühlten sich ledrig und dick an und waren bei der Linie #11 nach unten gebogen. Dies trifft auch auf die Blätter der *rev* Mutante zu. Die Wölbung der Blätter ist bei *rev* Pflanzen auf ein verstärktes Wachstum der Epidermis zurückzuführen, die ledrige Textur und die dunkle Farbe auf eine erhöhte Anzahl an chloroplastenhaltigen Zellschichten im Blatt (Talbert *et al.* 1995). Eine genauere Untersuchung der Blätter könnte zeigen, ob dies auch bei den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen der Fall ist. Im Unterschied zu den Blättern der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen sind die Rosettenblätter von *rev* Mutanten größer als Wildtypblätter, weil sie mehr Zellen enthalten. Die Zellzahl und -größe in Blättern von *pCLV3:ROCK2* Pflanzen wurde bislang noch nicht erfasst. Möglicherweise ist die Zellteilungsphase in

den Blättern verkürzt oder es werden weniger Zellen in die Blattprimordien rekrutiert als bei *rev*- und Wildtypblättern.

Die transgenen Pflanzen entwickeln um bis zu 68 % dickere Sprossachsen als der Wildtyp. Dies ist vermutlich auf das größere Sprossmeristem zurückzuführen, das mehr Zellen an die RZ und PZ abgibt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei cytokininbehandelten Pflanzen gemacht, die eine ca. 25 % dickere Sprossachse mit mehr Leitbündeln als die unbehandelten Kontrollpflanzen bildeten (Lindsay 2006). Auch andere Pflanzen mit erhöhtem Cytokininstatus, wie die *ckx3 ckx5* Mutanten (Bartrina *et al.* 2011), *rock2* und *rock3* Mutanten (Braun, unveröffentlichte Daten) und *IPT* überexprimierende Pflanzen (Rupp *et al.* 1999) entwickeln eine dickere Sprossachse. Pflanzen mit Cytokininmangel bilden dagegen einer dünnere Achse (Werner *et al.* 2003; Miyawaki *et al.* 2006). Trotz der erhöhten Zellzahl ist die Organisation des Sprossachsengewebes in *pCLV3:ROCK2* Pflanzen nicht gravierend verändert. Dies bedeutet, dass obwohl die Meristemorganisation teilweise extrem gestört ist, die Regulation der tieferen Schichten von RZ und PZ weitgehend normal und unabhängig von den Stammzellen funktioniert.

#### **4.2.2.2 Das veränderte Sprossmeristem von *pCLV3:ROCK2* Pflanzen**

Ein auffälliges Merkmal der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen war das stark vergrößerte Sprossmeristem (Abbildung 20 und 21). Drei Tage nach der Aussaat waren die Meristeme der transgenen Pflanzen normal organisiert und von ähnlicher Größe wie die des Wildtyps, doch bereits sechs Tage nach der Aussaat waren die Meristeme der transgenen Pflanzen um ca. das Vierfache vergrößert. Das extreme Wachstum des SAM setzte sich bis zum Öffnen der ersten Blüten fort, wobei mit zunehmender Größe der Meristemaufbau immer gestörter wurde. Die klonalen Schichten (L1 und L2, s. Abbildung 4A) waren bereits zehn Tage nach der Aussaat nicht mehr zu erkennen und das Meristem nahm eine stark nach außen gewölbte, unregelmäßige Form an. Zu diesem Zeitpunkt waren an den SAM-Rändern bereits Blütenprimordien erkennbar, während das Meristem des Wildtyps noch im vegetativen Stadium war. Die verstärkte Initiation der Blütenprimordien folgte keinem phyllotaktischen Muster, es entstanden mehrere Primordien gleichzeitig. Nach der Initiation folgte jedoch keine Verlängerung der Internodien, stattdessen akkumulierten die Blütenprimordien an der Sprossspitze und bildeten eine scheibenartige Struktur. Die Oberfläche des SAM wurde derweil immer unorganisierter, es entstanden Beulen, kleine Extrameristeme und z.T. wurden Primordien direkt auf der Meristemoberfläche gebildet.

#### *Mögliche Ursachen der Meristemvergrößerung*

In der Literatur gibt es einige Beschreibungen von Pflanzen mit vergrößerten Meristemen, z.B. Ethanol-induzierte antiARR7/15 amiRNA-Linien (Zhao *et al.* 2010), *aberrant phyllotaxis1* (Giulini *et al.* 2004), *amp1* (Nogué *et al.* 2000; Vidaurre *et al.* 2007), *ckx3 ckx5* (Bartrina *et al.* 2011), *clv1*

(Leyser und Furner 1992; Clark *et al.* 1993), *clv2* (Kayes und Clark 1998), *clv3* (Clark *et al.* 1995), *farnesyl transferase  $\beta$*  (Running *et al.* 1998; Bonetta *et al.* 2000; Yalovsky *et al.* 2000), *fasciata1* und *fasciata2* (Leyser und Furner 1992; Kaya *et al.* 2001), *gor* (Takano *et al.* 2010), *jabba-1D* (Williams *et al.* 2005), *mgoun1* und *mgoun2* (Laufs *et al.* 1998), *miniyo* (Sanmartín *et al.* 2011), *pluripetala* (Running *et al.* 2004), *tornado2* (Chiu *et al.* 2007), *pAPI:IPT4* (Li *et al.* 2010) und *p35S>>WUS-GR* (Yadav *et al.* 2010).

Bei vielen dieser Pflanzen hängt die Meristemvergrößerung mit einem auf ganz unterschiedliche Weise verursachten Anstieg der *WUS*-Aktivität im SAM zusammen. *WUS* regt die Teilung der Stammzellen an und ist damit ein positiver Regulator des Stammzellenpools und der SAM-Größe. Die induzierte Überexpression von *WUS* führt zu einer Vergrößerung des Sprossmeristems (Yadav *et al.* 2010). Die Expression von *WUS* wird durch die *CLV*-Proteine reprimiert (Brand *et al.* 2000; Schoof *et al.* 2000) und durch Cytokinin stimuliert (Gordon *et al.* 2009). Die externe Applikation des Hormons auf den Sprossapex führt zu einem kurzzeitigen Anstieg der *WUS*-Aktivität und dadurch temporär zu vergrößerten Meristemen (Lindsay *et al.* 2006; Chickarmane *et al.* 2012). Ein ähnlicher Effekt ist zu beobachten, wenn der pflanzeigene Cytokiningehalt im SAM durch eine Genmutation erhöht ist. Sowohl *amp1* (Chaudhury *et al.* 1993; Nogué *et al.* 2000; Vidaurre *et al.* 2007) als auch *ckx3 ckx5* Mutanten (Bartrina *et al.* 2011) enthalten im Sprossapex mehr Cytokinin und bilden als Folge davon größere Meristeme. Auch die Erhöhung des Cytokiningehalts durch ein Transgen führt zu diesem Phänotyp, so z.B. bei Pflanzen, die ein *IPT4* Gen spezifisch in Blütenprimordien exprimieren (Li *et al.* 2010). Bei *pAPI:IPT4* Pflanzen tritt die Vergrößerung des Meristems auf, obwohl das Cytokinin nicht im SAM selbst, sondern in den Blüten produziert wird. Es ist jedoch anzunehmen, dass das Hormon durch Diffusion oder Transport aus den Blütenprimordien in das angrenzende Meristem gelangt, wodurch der beobachtete Vergrößerungseffekt entstehen könnte.

Chickarmane *et al.* (2012) haben gezeigt, dass das *CLAVATA*-System im SAM Fluktuationen des Cytokiningehalts abpuffert. Wildtyppflanzen vergrößerten ihr Meristem nach Cytokininbehandlung um den Faktor 1,5, wohingegen sich das Meristem von *clv3* Mutanten um das 15-fache vergrößerte. In den *clv3 pCLV3:ROCK2* Hybriden wurde die Cytokininbehandlung quasi durch das Transgen ersetzt. Der beobachtete Effekt war vergleichbar. Das SAM der Hybriden war ca. fünfmal größer, als es die Addition der Meristeme beider Elternpflanzen erwarten ließ. Das heißt, dass das *CLAVATA*-System im *pCLV3:ROCK2* Hintergrund funktional ist und abpuffernd auf das verstärkte Cytokininsignal der Stammzellen wirkt.

Da bei vielen Pflanzen mit vergrößerten Meristemen eine verstärkte *WUS*-Expression nachgewiesen wurde (Brand *et al.* 2000; Kaya *et al.* 2001; Takano *et al.* 2010; Yadav *et al.* 2010; Bartrina *et al.* 2011), liegt die Vermutung nahe, dass dies auch in *pCLV3:ROCK2* Pflanzen der Fall sein könnte. Um die Größe der *WUS*-Domäne zu ermitteln, wäre es notwendig, durch In-situ-Hybridisierungen oder der Einkreuzung des *pWUS:GUS* Reportergenkonstrukts in *pCLV3:ROCK2* Pflanzen die Aktivität des

*WUS Promotors* sichtbar zu machen. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend durchgeführt werden, daher können an dieser Stelle nur Vermutungen geäußert werden.

Über den CLAVATA-WUSCHEL-Regelkreislauf hängt die Größe der *WUS*-Domäne mit der Größe der *CLV3*-Domäne zusammen (Brand *et al.* 2000; Schoof *et al.* 2000). Letztere ist in *pCLV3:ROCK2* Pflanzen vergrößert, wie die Untersuchung von heterozygoten *pCLV3:ROCK2 pCLV3:GFP* Pflanzen zeigte (Abbildung 22A). Die *WUS*-Domäne der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen könnte also proportional zur *CLV3*-Domäne vergrößert sein. Dieser Zusammenhang muss in den transgenen Pflanzen jedoch nicht unbedingt bestehen. Man kann spekulieren, dass durch die spezielle Natur des Transgens der CLAVATA-WUSCHEL-Kreislauf entkoppelt sein könnte. Das starke *CLV3*-Signal, das von der vergrößerten Stammzellendomäne abgegeben wird, könnte die *WUS*-Expression ähnlich stark unterdrücken wie es in *p35S:CLV3* Pflanzen geschieht (Brand *et al.* 2000). *CLV3*-überexprimierende Pflanzen können ihr SAM nicht erhalten, weil *WUS* die Teilung der Stammzellen nicht anregen kann. Dieses Problem könnte in *pCLV3:ROCK2* Pflanzen durch die Aktivität von *ROCK2* umgangen werden, da das konstitutive Cytokininsignal die Stammzellenteilung unabhängig von *WUS* anregen sollte. Die Aktivität des Transgens wäre auch ohne *WUS* gewährleistet, da die Aktivität des *CLV3* Promotors nicht ausschließlich von *WUS* abhängig ist. Dies wurde von Brand *et al.* (2002) gezeigt, die eine schwache Aktivität des *pCLV3:GUS* Reportergenkonstrukts im *wus* Hintergrund nachwies.

Die Untersuchung von *wus pCLV3:ROCK2* Hybriden zeigte, dass dieses spekulative Szenario nicht zutrifft, denn der *wus* Phänotyp ist epistatisch zum *pCLV3:ROCK2* Phänotyp. Das bedeutet, dass die durch *ROCK2* angeregte Teilung von *CLV3*-aktiven Zellen ohne *WUS* nicht in der Lage ist, das Meristem zu erhalten. Es ist daher also anzunehmen, dass *WUS* in den vergrößerten Meristemen von *pCLV3:ROCK2* Pflanzen exprimiert wird. Vermutlich hat *WUS* über die Anregung der Zellteilung und die Aktivierung des *CLV3* Promotors hinaus noch andere Funktionen, von denen die Stammzellen abhängen und die bisher nicht bekannt sind.

Einen Sonderstatus unter den Pflanzen mit vergrößertem SAM nimmt die *gor* Mutante ein (Takano *et al.* 2010). Diese Pflanzen beginnen nach der Keimung damit, ihr SAM kontinuierlich zu vergrößern, bis es schließlich eine ähnliche Größe erreicht wie das SAM von *pCLV3:ROCK2* Pflanzen. In dem vergrößerten vegetativen Meristem der *gor* Mutante sind sowohl die *WUS*- als auch die *CLV3*-Domäne verbreitert. Nach der Produktion weniger Blätter beginnt das Meristem in der generativen Phase, eine Vielzahl von Blütenprimordien anzulegen, die sich zu radialsymmetrischen, filiformen Organen entwickeln, die denen der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen ähneln. Der *CLV3* Promotor ist in sämtlichen Zellen der vergrößerten Meristemoberfläche aktiv, allerdings nicht in den filiformen Organen. Die Pflanzen elongieren einen meist unverzweigten Spross, dessen verbreiteter Apex sich schließlich in eine Vielzahl kleiner Äste aufspaltet, die sterile Blüten tragen. Die Ursache dieses Phänotyps ist der mutationsbedingte Austausch einer Aminosäure in der DNA-bindenden Homeodomäne von *STM* (Arginin 339 → Lysin, Takano *et al.* 2010). Die meisten

Homeodomänenproteine tragen in ihrer DNA-Bindedomäne vier konservierte Aminosäuren, darunter ein Arginin. WUS, ebenfalls ein Homeodomänenprotein, weicht von diesem konservierten Aminosäurenmuster ab und enthält anstatt eines Arginins ein Lysin, so wie das GOR Protein. Es ist möglich, dass in *gor* Pflanzen das mutierte STM-Protein teilweise Funktionen von WUS übernimmt und dadurch WUS-Zielgene stärker aktiviert werden, was zu einer Vergrößerung des SAM führen könnte. Da das SAM von *pCLV3:ROCK2* dem der *gor* Mutanten sehr ähnlich ist, beeinflusst das ektopische Cytokininsignal möglicherweise die Expression ähnlicher Zielgene wie das mutierte GOR Protein.

#### *Mögliche Gründe für die Veränderung der SAM-Form*

Die WUS-Expression kann durch die Abregulation des CLAVATA-Systems erhöht werden, wie es bei den *clv* Mutanten der Fall ist (Brand *et al.* 2000; Schoof *et al.* 2000) oder nach der Aktivierung eines induzierbaren *antiCLV3* RNAi-Konstrukts (Reddy und Meyerowitz 2005). Die Folge ist auch hier ein vergrößertes SAM, wobei bei den *clv* Mutanten ähnliche Verformungen des Meristems auftreten, wie bei den Meristemen der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen (Abbildung 21B). Die Ausbeulungen auf dem SAM könnten dadurch entstehen, dass sich die Zellen des Meristems schneller teilen als dass sie in Primordien an die Peripherie abgegeben werden können. Da die Zellen das SAM nicht verlassen können, beginnen sie, sich in kleinen Beulen aufzutürmen. Eine andere Erklärung für die Entstehung der Beulen könnten lokal unterschiedliche Teilungsaktivitäten sein, d.h. die Beulen würden sich aus schnell teilenden Zellen zusammensetzen, die von weniger teilungsaktiven Zellen umgeben sind. Ob alle Zellen dabei ihre Stammzellenidentität erhalten, ist bisher nicht geklärt. Die Einführung von *pCLV3:GFP* und *pWUS:GFP* in die *pCLV3:ROCK2* Pflanzen und die Untersuchung der fluoreszenzmarkierten Meristeme am konfokalen Lasermikroskop könnte Klarheit über die Zellidentitäten in den unorganisierten Sprossapices bringen. Das im Rahmen der Arbeit erstellte *pWUS*-Konstrukt fluoreszierte jedoch nicht und von den *pCLV3:GFP pCLV3:ROCK2* doppelt transgenen Pflanzen wurden bislang nur heterozygote Individuen mit moderatem Meristemphänotyp untersucht. In diesen ist das SAM zwar vergrößert, aber nicht deformiert. Die durch *GFP*-Expression markierte Stammzellendomäne war in Bezug auf die Gesamtfläche des SAM proportional vergrößert (Abbildung 22A). In den deformierten Meristemen homozygoter Pflanzen könnte der *pCLV3:GFP* Reporter entweder gleichmäßig in allen Zellen der oberen SAM-Schichten aktiv sein oder nur in kleinen Inseln, die den Ausbeulungen des Meristems entsprechen. Als Parallelstrategie zu der konfokalen Lasermikroskopie könnten auch In-situ-Hybridisierungen mit *WUS* und *CLV3* Antisense-Sonden in den Meristemen der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen durchgeführt werden.

Bei den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen der Linie #11 entstehen so viele Ausbeulungen auf dem Meristem, dass eventuell der polare Auxintransport nicht störungsfrei funktionieren kann. Durch die Veränderungen des Transports könnten auf der SAM-Oberfläche kleine Auxinmaxima entstehen, aus denen heraus sich dann ektopische Primordien bilden. Die Einkreuzung des *DR5:GFP*

Auxinreporterkonstrukts könnte zeigen, ob dies zutrifft. Auch in diesem Fall wurden im Rahmen der Arbeit bisher nur heterozygote *DR5:GFP pCLV3:ROCK2* Pflanzen mit moderatem Meristemphänotyp untersucht (Abbildung 22B). GFP wurde, wie auch im Wildtyp, in kleinen, kreisförmig angeordneten Zellgruppen an den Meristemrändern detektiert. Die Untersuchung von homozygoten Pflanzen wird zeigen, ob diese Regelmäßigkeit in stark deformierten Meristemen verändert ist.

#### *Die Veränderung des SAM während der Blühphase*

Nach dem Öffnen der ersten Blüten verkleinerte sich das Meristem der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen kontinuierlich, was mit einer Veränderung der Form einherging. Zunächst wurde das SAM konkav und faltig. Nachdem ca. 30 % der Blüten geöffnet waren, hatte es schließlich eine wildtypähnliche, wenngleich leicht vergrößerte Form angenommen. Diese Veränderungen könnten auf eine verringerte Teilungsaktivität der Stammzellen zurückgehen. Möglicherweise schwächt sich die Expression des *pCLV3:ROCK2* Transgens mit fortschreitendem Alter ab, so dass der ektopische Cytokinineinfluss auf die Stammzellen abnimmt.

67 Tage nach der Aussaat produzierten transgene Pflanzen der Linie #8 am Hauptspross keine Blüten mehr, nur die Nebensprosse waren noch produktiv. Die Spitze des Hauptsprosses war kallusartig verdickt und hatte keine Ähnlichkeit mit einem SAM. Möglicherweise verhindert die Expression von *ROCK2* die vollständige Termination des gealterten Hauptmeristems, das sich weitgehend aufgebraucht hat. Da den teilungsaktiven Zellen die für die Differenzierung notwendige Umgebung fehlt, bilden sie anstelle von Organen Kallusgewebe.

Ein Teil der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen der Linie #11 erreichte diesen Endzustand des SAM nicht. Diejenigen Pflanzen, die einen #11.2 Phänotyp entwickelten (s. Abschnitt 3.2.2.4), stellten das Wachstum des Sprossapex nach der Bildung einer Vielzahl von Filamenten ein. Bei *rev* Mutanten wurde Ähnliches beobachtet (Talbert *et al.* 1995). Histologische Untersuchungen dieser Pflanzen hatten gezeigt, dass die Meristeme anstatt kleiner Zellen mit viel Cytoplasma große Zellen mit großen Vakuolen enthielten. Es hatte also Differenzierung stattgefunden und die Meristeme hatten ihre Aktivität eingestellt, ebenso die Primordien (Talbert *et al.* 1995). Möglicherweise sehen die Meristeme der *pCLV3:ROCK2* #11.2 Pflanzen ähnlich aus. Der #11.2 Phänotyp trat nur gelegentlich auf, was bedeutet, dass er wahrscheinlich von bestimmten Bedingungen abhängig ist. Wahrscheinlich sind die stark proliferierenden Meristeme in besonderem Maße auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen angewiesen. Kann die Versorgung des teilungsaktiven Gewebes nicht durchgängig gewährleistet werden, könnte das SAM sein Wachstum einstellen. Es ist davon auszugehen, dass die Bedingungen im Gewächshaus nicht konstant waren. Schwankungen können bei der Temperatur, der Lichtstärke, der Luftfeuchtigkeit, der Wasser- oder der Nährstoffverfügbarkeit auftreten. Um den oder die für den Phänotyp #11.2 ausschlaggebenden Faktoren zu identifizieren, könnte man *pCLV3:ROCK2* #11.2 Pflanzen in Klimaschränken, die konstantere Wachstumsbedingungen ermöglichen, anziehen und in parallelen Versuchen die genannten Parameter einzeln variieren.



#### 4.2.2.3 Der Blütenphänotyp von *pCLV3:ROCK2* Pflanzen

Nicht nur die Entwicklung des Sprossmeristems ist bei *pCLV3:ROCK2* Pflanzen gestört, auch die Blütenmeristeme sind verändert. Besonders auffällig sind die radialsymmetrischen Organe, die das SAM nach dem Ende der vegetativen Phase bildet (Abbildung 23). In der Literatur sind solche Strukturen bei *fil* (filamentous flower; Chen *et al.* 1999; Sawa *et al.* 1999a; Sawa *et al.* 1999b), *rev* (Talbert *et al.* 1995) und *gor* Mutanten (Takano *et al.* 2010) belegt. In *fil* Mutanten wurde anhand von Untersuchungen der Epidermis- und Zellstruktur sowie der Verteilung der Stomata belegt, dass es sich bei den Filamenten um Blütenstiele handelt, die an ihrer Spitze ihre FM-Identität eingebüßt haben (Chen *et al.* 1999; Sawa *et al.* 1999a). Bei den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen müsste dies anhand von genaueren Aufnahmen am REM noch belegt werden. FIL ist ein Transkriptionsfaktor, der während der Initiation von Blütenprimordien aktiv wird und später an der abaxialen Seite des Blütenprimordiums und der Blütenorganprimordien exprimiert wird. Er ist an der Entwicklung des Blütenprimordiums, der Etablierung des Blütenmeristems und der Initiation von homöotischen Genen während der Blütenbildung beteiligt. Die Untersuchung der FIL-Aktivität durch In-situ-Hybridisierungen in den *pCLV3:ROCK2* Pflanzen könnte zeigen, ob die Expression des Transkriptionsfaktors durch das konstitutive Cytokininsignal in den Stammzellen durch einen nicht-zellautonomen Mechanismus beeinträchtigt ist.

Die *rev* Mutante bildet neben normalen Blüten ebenfalls radialsymmetrische Filamente aus (Talbert *et al.* 1995). Diese wurden wie bei den *fil* Mutanten als Blütenstiele ohne Blütenmeristem interpretiert. Die Anhäufung phänotypischer Übereinstimmungen zwischen *rev* Mutanten und *pCLV3:ROCK2* Pflanzen festigt die Vermutung, dass durch das verstärkte Cytokininsignal in den Stammzellen ein reprimierender Effekt auf *REV* (oder *REV*) ausgeübt wird. Dies wird umso wahrscheinlicher wenn man bedenkt, dass *REV* in den Meristemen von Wildtyppflanzen auch in der *CLV3*-Domäne aktiv ist (Otsuga *et al.* 2001).

Auch die bereits erwähnte *gor* Mutante bildet entlang ihres Infloreszenzsprosses grüne Filamente, die als unterentwickelte Blüten ohne meristematische Aktivität interpretiert wurden (Takano *et al.* 2010). Durch Untersuchungen mit einem *pCLV3:GUS* Reportergenkonstrukt in *gor* Mutanten wurde gezeigt, dass *CLV3* in den Filamenten nicht exprimiert wird und diese folglich kein FM besitzen. Offenbar gibt es hier einen Steuermechanismus, der aus dem SAM heraus die Etablierung des FM unterbindet. Dies findet entweder schon dann statt, wenn das Blütenprimordium beginnt, sich zu etablieren oder zu einem späteren Zeitpunkt. Es erfordert weitere Untersuchungen, um herauszufinden, ob dieser Mechanismus bei den filiformen Blüten der *gor* Mutante und der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen derselbe ist. In dieser Hinsicht wäre es interessant, die Aktivität des *TCS:GFP* Reporterkonstrukts in den beiden genetischen Hintergründen zu vergleichen. Es ist anzunehmen, dass in *pCLV3:ROCK2* Pflanzen ein starkes *TCS*-Signal die Stammzellendomäne markiert. Die Störung der FM-Initiation in *pCLV3:ROCK2* Pflanzen wäre also abhängig von einem starken ektopischen Cytokininsignal in der CZ. Wäre ein solches auch in den Stammzellen der *gor* Mutanten zu beobachten, bestünde ein erster

Hinweis, dass die Entwicklung der Blütenprimordien bei den beiden Pflanzen über einen ähnlichen Mechanismus fehlgeleitet wird.

*pCLV3:ROCK2* Pflanzen entwickeln neben den Filamenten auch funktionale Blüten, die im Vergleich zum Wildtyp vergrößert sind und meist mehr Organe enthalten, die z.T. missgebildet sind (Abbildung 23). Solche Blüten wurden auch bei cytokininbehandelten Pflanzen beobachtet (Lindsay *et al.* 2006; Marsch-Martínez *et al.* 2012) oder bei Pflanzen, die größere Blütenmeristeme bilden, wie z.B. *pAP1:IPT* (Li *et al.* 2010), *ckx3 ckx5* Mutanten (Bartrina *et al.* 2011) oder *clv* Pflanzen (Clark *et al.* 1993, 1995). Die erhöhte Anzahl der Organe ist vermutlich auf die Vergrößerung des FM, die durch das verstärkte Cytokininsignal in der CZ bewirkt wird, zurückzuführen (Li *et al.* 2010). Die Größenzunahme des FM könnte die Expression homöotischer Blütengene (ABCE-Gene, umfassend besprochen in Krizek und Fletcher 2005) beeinflussen, was die Ursache für die missgestalteten Blütenorgane der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen sein könnte. Es ist auch denkbar, dass das Cytokininsignal aus dem Zentrum des FM heraus direkt die ABCE-Gene beeinflusst, doch gibt es in der Literatur bisher kaum Anhaltspunkte, dass Cytokinin homöotische Blütengene in direkter Weise beeinflusst (Estruch *et al.* 1993).

### 4.3 Die Veränderung des Cytokininstatus in der WUS-Domäne

Das OZ, dessen Identität und Größe durch die Aktivität des *WUS* Gens definiert wird, befindet sich direkt unterhalb der *CLV3*-Domäne (Mayer *et al.* 1998). Das *TCS*-Reporterkonstrukt markiert diesen Meristembereich als Ort hoher Cytokininaktivität (Gordon *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2011). Ein In-silico-Modell gab Hinweise darauf, dass ein räumlich scharf begrenztes, hohes Cytokininsignal dabei helfen könnte, das OZ vom umgebenden Gewebe abzugrenzen (Gordon *et al.* 2009). Das Cytokininsignal wird im OZ hauptsächlich durch die Rezeptoren AHK3 und AHK4 vermittelt (Mähönen *et al.* 2006b; Gordon *et al.* 2009). Sie aktivieren unter anderem *WUS*, das selbst verstärkend auf die Cytokininsignaltransduktion wirkt, indem es die Transkription der das Cytokininsignal negativ regulierenden A-Typ *ARR* Gene reprimiert (Leibfried *et al.* 2005; Gordon *et al.* 2009). Trotzdem gibt es eine Restaktivität verschiedener A-Typ *ARRs* im Meristemzentrum, da sie durch das Cytokininsignal antagonistisch zur Repression durch *WUS* aktiviert werden (Leibfried *et al.* 2005). Da im OZ bisher keine Aktivität von cytokininaktivierenden LOG-Enzymen nachgewiesen werden konnte, kann es sein, dass Cytokinin aus anderen Meristembereichen in die *WUS*-Domäne gelangt, z.B. aus den Stammzellen (Chickarmane *et al.* 2012). Chickarmane *et al.* (2012) zeigten in einem Computermodell, dass in der SAM-Epidermis produziertes Cytokinin einen Hormongradienten im Meristem etablieren könnte, der gemeinsam mit dem *CLAVATA*-System für die dynamische Positionierung der *WUS*-Domäne verantwortlich sein könnte.

Experimente, die sich mit der Wirkung von Cytokinin auf das OZ beschäftigen, basieren bisher nur auf Versuchen mit Hormonerhöhungen im ganzen SAM. Nur in der Doktorarbeit von Holst (2009)

wurde versucht, den Cytokininstatus auf das OZ begrenzt zu verringern, allerdings ohne dass ein Phänotyp beobachtet werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *WUS* Promotor verwendet, um Gene aus dem Cytokininkontext spezifisch im OZ zu exprimieren. Dabei sollte jedoch nicht vergessen werden, dass das *WUS* Gen auch in Blütenmeristemen aktiv ist und dort die Termination des FM steuert (Lenhard *et al.* 2001), sowie in Gynoecien, wo es maßgeblich an der Entwicklung der Samenanlagen beteiligt ist (Groß-Hardt *et al.* 2002) und während der Embryogenese (Mayer *et al.* 1998).

#### 4.3.1 Absenkung des Cytokininstatus in der *WUS*-Domäne

Ähnlich wie *pWUS:CKX3* transgene Pflanzen (Holst 2009) zeigten Pflanzen, die ein *pWUS:CKX1* oder ein *pWUS:ARR1-SRDX* Konstrukt trugen, keinen Phänotyp, obwohl die Expression des Transgens nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise ist der *WUS* Promotor nicht stark genug, *CKX1*, *CKX3* und *ARR1-SRDX* so zu exprimieren, dass sie den Cytokininstatus im OZ merklich absenken können. Die Transkription von *WUS* wird durch Cytokinin angeregt (Gordon *et al.* 2009; Chickarmane *et al.* 2012). Es ist daher möglich, dass das Absenken des Cytokininstatus zu einer schwächeren Expression des Transgens führt, die die Entstehung eines starken Cytokinindefizits im OZ verhindert. Daher könnte es interessant sein, einen anderen OZ-spezifischen Promotor für den Versuch auszuwählen. Aggarwal *et al.* (2010) identifizierten drei spezifisch im OZ aktive Promotoren, die eventuell stärker sein könnten als der *WUS* Promotor: *pB3*, *pCK* und *pCKX3*. Der *CKX3* und der *CK* Promotor sind cytokininreguliert (Brenner *et al.* 2005) und sollten nicht verwendet werden, der *B3* Promotor kommt jedoch für eine Verwendung in Frage.

So wie bei den *pCLV3:CKX* exprimierenden Pflanzen ist auch bei *pWUS:CKX* Pflanzen denkbar, dass ein Cytokinineinstrom aus dem das OZ umgebenden Gewebe den verstärkten Cytokininabbau ausgleicht. Da jedoch auch bei *pWUS:ARR1-SRDX* Pflanzen, die im OZ gegenüber Cytokinin unempfindlich sein sollten, keine Veränderung des Phänotyps beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt keine Rolle spielt. Um zu überprüfen, ob das starke Cytokininsignal im OZ durch die Transgenexpression verändert wurde, könnte man *TCS:GFP pWUS:CKX1/ARR1-SRDX* Hybride untersuchen.

Möglicherweise puffert auch bei *pWUS:CKX/ARR1-SRDX* Pflanzen das *CLAVATA*-System hormonelle Veränderungen im Meristemzentrum auf eine solche Weise ab, dass kein Phänotyp sichtbar werden kann. Die Expression von *pWUS:CKX1* oder *pWUS:ARR1-SRDX* könnte in einem *clv* Hintergrund dagegen deutliche Veränderungen des SAM erzielen (Dominique Sturm, Masterarbeit, unveröffentlicht). Möglicherweise ist ein geringerer Cytokininsatus in der *WUS*-Domäne in der Lage, die extreme SAM-Größe der *clv* Mutanten zu reduzieren.

### 4.3.2 Erhöhung des Cytokininstatus in der *WUS*-Domäne

Die Expression des *pWUS:ROCK2* Transgens bewirkte in *Arabidopsis* eine drastische Veränderung des Phänotyps (Abbildung 16B, E). Primärtransformanten mit einem Typ A Phänotyp stellten nach der Produktion einiger Blätter die Bildung weiterer Organe ein, die Pflanze verharrte im Keimlingsstadium und der Sprossapex wuchs zu einer kugelförmigen, trichombedeckten Struktur heran. Diese bestand im Innern hauptsächlich aus einer Vielzahl kleiner, undifferenzierter Zellen, die von einer dünnen Schicht aus Leit- und Cortexgewebe umgeben war. Auch Primärtransformanten vom Typ B wurden nicht größer als zwei Wochen alte Keimlinge. Diese Pflanzen brauchten ihr SAM nach der Bildung weniger, z.T. filiformer Blätter auf. T<sub>1</sub>-Pflanzen vom Typ C bildeten einen verdickten nadelförmigen Spross, der entweder keine oder nur wenige Blüten hervorbrachte. Diese Pflanzen waren in der Lage, Seitensprosse zu bilden, die sich normal entwickelten. Der Typ C Phänotyp ging in den Folgegenerationen verloren. qRT-PCR Daten zeigten, dass *ROCK2* in den Pflanzen aller Phänotypkategorien exprimiert wurde. In Bezug auf den Vergleich der Expressionsstärke von *ROCK2* zwischen den verschiedenen Phänotypen sollten die qRT-PCR-Daten mit Vorsicht interpretiert werden. Da sich die untersuchten Pflanzen morphologisch sehr stark voneinander unterscheiden, können die Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden (Demidenko und Penin 2012).

#### *Die Expression von WUS in pWUS:ROCK2 Pflanzen*

Der *WUS* Promotor wird durch die Cytokininsignaltransduktion im OZ angeschaltet (Gordon *et al.* 2009). Das bedeutet, dass in *pWUS:ROCK2* Pflanzen wahrscheinlich nicht nur die Transkription von endogenem *WUS* heraufreguliert wird, sondern auch, dass das unter dem *WUS* Promotor exprimierte *ROCK2* Transgen verstärkend auf seine eigene Aktivität wirkt. Damit wird die Zellteilung im SAM quasi zweifach angeregt. Einerseits aktiviert die große Menge an *WUS* vermutlich vermehrt die Teilung der Stammzellen, andererseits regt das Cytokininsignal von *ROCK2* möglicherweise die Zellteilung im OZ an. Da die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten In-situ-Hybridisierungen in *pWUS:ROCK2* Pflanzen nicht funktioniert haben, ist bisher ungeklärt, in welchen Bereichen des kugelförmigen Sprossapex *CLV3* und *WUS* exprimiert werden.

*pCLV3:WUS* Pflanzen bilden einen ähnlichen Phänotyp aus wie *pWUS:ROCK2* Pflanzen vom Typ A (Brand *et al.* 2002). In *pCLV3:WUS* Pflanzen wurden *WUS* und *CLV3* in einer dreilagigen Schicht aus kleinen Stammzellen auf der Oberfläche des kugelförmigen SAM co-exprimiert. Der kugelige Sprossapex wurde nur von den Kotyledonen flankiert, Blätter wurden nicht gebildet. Das Gewebe im Innern des Apex bestand aus großen vakuolierten Zellen, Leitgewebe war nirgendwo erkennbar. Des Weiteren wurden keine Trichome gebildet (Brand *et al.* 2002). Dies entspricht nicht dem Aussehen der *pWUS:ROCK2* Pflanzen, daher ist anzunehmen, dass *CLV3* und *WUS* in einer anderen Weise exprimiert werden, als in den *pCLV3:WUS* Pflanzen. Denkbar wäre, dass in einer vergrößerten Stammzellendomäne *CLV3* überproduziert wird und *WUS*-aktive Zellen deswegen weit unterhalb der Stammzellen liegen.

Der *WUS* Promotor wird sehr früh in der embryonalen Entwicklung angeschaltet, genauer im 16-Zellen-Stadium (Boscá *et al.* 2011). Möglicherweise ist in stark exprimierenden *pWUS:ROCK2* Pflanzen bereits die Embryogenese verändert. Transgene Embryonen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Pflanzen mit einem starken Typ A oder Typ B Phänotyp waren steril. Typ C *pWUS:ROCK2* Pflanzen hatten einen moderaten Phänotyp und bildeten Samen, die untersucht werden könnten. Da allerdings die Nachkommen von Typ C Pflanzen in der T<sub>2</sub>-Generation ihren Phänotyp verloren, ist es eher unwahrscheinlich, dass ein embryonaler Phänotyp beobachtet werden kann. Abhilfe könnte die Expression eines induzierbaren *pWUS:ROCK2* Konstrukts bringen. Nach der Selektion von nicht-induzierten Primärtransformanten könnten diese während der Blühphase induziert werden und die embryonale Entwicklung untersucht werden. Alkoholinduzierbare *pWUS>>ROCK2* Pflanzen wurden bereits generiert und es liegen Samen der T<sub>1</sub>-Generation vor. Eine Untersuchung steht allerdings noch aus.

#### *Auxintransport und Primordieninitiation in pWUS:ROCK2 Pflanzen*

Da bei *pWUS:ROCK2* Pflanzen offensichtlich die Primordienentwicklung gestört ist, liegt die Vermutung nahe, dass der Auxintransport und/oder die Auxinsignaltransduktion nicht richtig funktionieren, so wie es bei den nadelförmigen *mp* oder *pin1* Pflanzen der Fall ist (Reinhardt *et al.* 2000; Reinhardt *et al.* 2003). *pWUS:ROCK2* Pflanzen vom Typ C erinnern mit ihrem nadelförmigen Spross an diese beiden Mutanten. Wäre nun bei den *pWUS:ROCK2* Pflanzen der Auxintransport gestört, könnte die punktuelle Applikation des Hormons auf den Sprossapex die Bildung eines Primordiums bewirken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, bei drei Typ C Pflanzen der Linie #2 durch die Applikation von Auxin ein Primordium zu induzieren, was allerdings erfolglos blieb (Daten nicht gezeigt). Es könnte daher anstatt des Transports die Auxinsignaltransduktion gestört sein, so wie bei *mp* Mutanten. Letztlich sind jedoch sowohl die *pin1* als auch die *mp* Mutanten nur teilweise mit den *pWUS:ROCK2* Pflanzen vom Typ C vergleichbar, da letztere trotz eines nadelförmigen Hauptsprosses in der Lage sind, normal blühende Seitensprosse zu etablieren, was bedeutet, dass Auxintransport und -signaltransduktion grundsätzlich funktionsfähig sein müssen.

*pin1 mp* Doppelmutanten, bei denen Auxintransport und -signaltransduktion simultan deaktiviert sind (Schuetz *et al.* 2008), weisen Ähnlichkeit mit den *pWUS:ROCK2* Pflanzen vom Typ A auf. Die Doppelmutanten entwickeln kugelförmige Sprossapices, die keinerlei Primordien bilden. *mp* Mutanten, die mit dem Auxintransporthemmstoff NPA behandelt wurden, entwickelten exakt den gleichen Phänotyp (Schuetz *et al.* 2008). PIN1 ist in diesen Pflanzen gleichmäßig über den ganzen Sprossapex verteilt und mit dem *DR5:GUS* Reporterkonstrukt konnten keine Auxinmaxima nachgewiesen werden. *STM* und *CLV3* sind in diesen Pflanzen aktiv, was für die Gegenwart von Stammzellen und anderen meristematischen Geweben spricht. In *pWUS:ROCK2* Pflanzen vom Typ A reprimiert das starke Cytokininsignal eventuell den polaren Auxintransport im Meristem. Cytokinin reguliert in der Wurzel den Abbau von PIN1 in Abhängigkeit von den Cytokininrezeptoren,

hauptsächlich von *AHK4* (Marhavý *et al.* 2011), sowie die *PIN*-Expression (Laplaze *et al.* 2007). *PIN1* ist jedoch nicht im OZ aktiv, daher müsste die mögliche *PIN1*-Degradierung in den *pWUS:ROCK2* Pflanzen, wenn überhaupt, eher durch ein nicht-zellautonomes, cytokinininduziertes Signal zustandekommen. Aus Wurzelmeristemen ist bekannt, dass Cytokinin die Aktivität von ARF-Proteinen negativ beeinflussen kann, indem es die Transkription von *SHY2*, einem direkten ARF-Inhibitor, aktiviert (Dello Ioio *et al.* 2008b). Durch diesen Mechanismus kontrolliert Cytokinin die Größe des RAM. Aus dem SAM ist über eine solche Art der Interaktion zwischen Cytokinin und Auxin nichts bekannt, es wäre aber denkbar, dass *ROCK2* verstärkt die Transkription eines *SHY2*-ähnlichen Gens aktiviert, dass ein Auxinsignal im SAM und damit die Primordienbildung reprimieren könnte. Der Phänotyp von *pWUS:ROCK2* Pflanzen gibt also Anlass zu spekulieren, dass im SAM ein ähnlicher Mechanismus agieren könnte.

Abgesehen von der kugelförmigen Apexform sind *pWUS:ROCK2* Pflanzen vom Typ A und *mp pin1* bzw. NPA-behandelte *mp* Mutanten sehr unterschiedlich. Die Auxinmutanten bilden außer den Kotyledonen keine Blätter und das vom Sprossapex gebildete Gewebe zeigt keine Differenzierungserscheinungen wie Trichome, eine Epidermis oder Leitgewebe (Schuetz *et al.* 2008). Stattdessen bildeten sich an der Basis des kugeligen Apex weitere Kugelstrukturen. Später bildeten sich auf der Oberfläche des Apex filiforme Organe, die als Blüten interpretiert wurden. Nichts dergleichen wurde bei *pWUS:ROCK2* Pflanzen beobachtet. Es ist daher fraglich, ob der kugelförmige Sprossapex der *pWUS:ROCK2* Pflanzen durch eine gleichzeitig veränderte *PIN1* und *MP* Expression verursacht wird. Ein erster Schritt, um die Frage nach dem Auxintransport in den transgenen Pflanzen zu klären, wäre die Transformation von *DR5:GFP/GUS* und *pPIN1:PIN1-GFP* Pflanzen mit dem *pWUS:ROCK2* Konstrukt.

Ein aus Maismeristemen bekannter Interaktionsmechanismus zwischen Cytokinin und Auxin basiert auf dem A-Typ *ARR* Gen *ABPH1* (Giulini *et al.* 2004). *ABPH1* wird durch Cytokinin induziert und reguliert die Expression und Verteilung von *PIN1* (Lee *et al.* 2009a). Zusätzlich wird *PIN1* durch Cytokinin induziert und Auxin wirkt positiv auf die Expression von *ABPH1*. Ein vergleichbarer Mechanismus ist im SAM von Arabidopsis nicht bekannt. *WUS* reprimiert die Expression einiger A-Typ *ARR* Gene, Cytokinin induziert sie. Ob in *pWUS:ROCK2* Pflanzen die Aktivierung der *ARRs* durch *ROCK2* stärker ist oder die Repression durch eventuell übermäßig vorhandenes *WUS*, ist nicht geklärt. Eine verstärkte Repression eines zu *ABPH1* vergleichbaren Gens könnte zu einer Unterdrückung der möglicherweise *ARR*-gesteuerten Organogenese führen. Umgekehrt könnte die Überaktivierung von A-Typ *ARRs* den Auxinfluss so stark verändern, dass die Regulation der Phyllotaxis zusammenbricht und die Primordienbildung eingestellt wird.

Microarray-Experimente und Promotoruntersuchungen zeigten, dass *WUS* in der Lage ist, direkt an die Promotoren von Genen zu binden, die für Auxintransport und –signalübertragungsproteine kodieren (Busch *et al.* 2010). Möglicherweise wird der Auxinstatus und damit die Primordienbildung

in *pWUS:ROCK2* Pflanzen direkt durch übermäßig aktives WUS beeinflusst. Um dies zu untersuchen, müssten Expressionsanalysen der von Busch (2010) identifizierten Gene durchgeführt werden.

Möglicherweise ist es auch einfach die veränderte Struktur der *pWUS:ROCK2* Apices, die die normale Funktion der Primordienbildung stört. Eine Möglichkeit, diese Idee weiter zu verfolgen, bestünde darin, die vermutlich starke Zellteilung in den *pWUS:ROCK2* Pflanzen einzudämmen, damit der Sprossapex nicht so stark anschwillt und eine normale Organisation eher möglich ist. Die Aktivität der Zellzyklusgene *CYCD3;1-3* bestimmt darüber, wie lange die Zellen eines Gewebes im mitotischen Zyklus verbleiben und sich teilen (Dewitte *et al.* 2007). Das SAM von *cycD3;1-3* Mutanten ist verkleinert, aber normal organisiert und funktionsfähig. Die Transformation dieser Mutanten mit dem *pWUS:ROCK2* Transgen könnte zeigen, ob eine Reduktion der Zellteilung ausreicht, die Organisation des Apex von *pWUS:ROCK2* Pflanzen zu normalisieren.

#### *Vergleich der pCLV3:DRN Pflanzen mit pWUS:ROCK2 Pflanzen*

In der Literatur gibt es noch eine weitere Publikation, in der Pflanzen mit kugelförmigem Apex belegt sind (Kirch *et al.* 2003). *pCLV3:DRN* Pflanzen sind *pWUS:ROCK2* Pflanzen sehr ähnlich. Pflanzen mit starkem *pCLV3:DRN* Phänotyp initiieren zwei bis vier Blätter, danach werden etwa ebenso viele grüne radialsymmetrische Organe entwickelt, vermutlich ebenfalls Blätter. Die Sprossachse wächst hauptsächlich in die Breite und bildet später eine kugelförmige Struktur, die mit Trichomen bedeckt ist. Diese Entwicklung ist identisch mit der von Typ A *pWUS:ROCK2* Pflanzen. REM-Aufnahmen zeigen auf der Spitze von verdickten *pCLV3:DRN* Sprossen ein normal strukturiertes SAM und Primordien, deren Wachstum offensichtlich gestoppt ist, da keine weiteren lateralen Organe auswachsen. Vergleichende Untersuchungen mit *pWUS:ROCK2* Pflanzen stehen noch aus. In Längsschnitten durch *pWUS:ROCK2* Sprosse wurden bisher jedoch keine SAM-ähnlichen Strukturen an der Spitze des Sprossapex gefunden. Transgene *pCLV3:DRN* Linien, die einen schwächeren Phänotyp ausbilden, entwickeln sich zunächst so wie die zuerst beschriebenen Pflanzen, sind jedoch in der Lage, die stark verdickte Sprossachse zu verlängern. An der Sprossspitze werden schließlich einige fertile Blüten gebildet. Diese Entwicklung ähnelt der von Typ C *pWUS:ROCK2* Pflanzen. Im Unterschied zu diesen erhielten die *pCLV3:DRN* Pflanzen ihren Phänotyp jedoch auch in den folgenden Generationen. Überexpression von *DRN* führt zu kleinen Pflanzen mit drei bis vier Blättern, deren SAM sich mit der Bildung eines radialsymmetrischen Organs aufbraucht (Kirch *et al.* 2003). Dieser Phänotyp ähnelt dem von Typ B *pWUS:ROCK2* Pflanzen.

*DRN/ESR1 (DORNRÖSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1)* kodiert für einen AP2/ERF Transkriptionsfaktor, und wurde entdeckt, weil *drn-D gain-of-function* Mutanten in der Lage sind, aus Wurzelkulturen ohne die Zugabe von Cytokinin einen Spross zu etablieren (Banno *et al.* 2001). *DRN* wird möglicherweise durch Cytokinin positiv reguliert. Das Gen wird im Embryo und in den Stammzellen exprimiert und ist eventuell an der Regulation von *CLV3* mit beteiligt (Kirch *et al.* 2003). *drn* Mutanten entwickeln keinen sichtbaren Phänotyp. Möglicherweise wird *DRN* in

*pWUS:ROCK2* ektopisch aktiviert, es wäre daher interessant, In-situ-Hybridisierungen mit *DRN* antisense Sonden durchzuführen. Um zu untersuchen, ob der *pWUS:ROCK2* Phänotyp durch *DRN* vermittelt wird, könnte man das Transgen in den *drm* Hintergrund transformieren und beobachten, ob der *pWUS:ROCK2* Phänotyp schwächer ausgeprägt ist.

In *drm-D* Mutanten, die verbreiterte frühzeitig terminierende Meristeme bilden, werden *DRN*, *WUS* und *CLV3* in einer Domäne weit unterhalb der SAM-Oberfläche co-exprimiert. *DRN* ist also in der Lage, die Expression von *WUS* und *CLV3* direkt oder indirekt zu beeinflussen. Es gibt bisher keine Daten, die zeigen, in welcher Weise die drei Gene miteinander interagieren. Möglicherweise aktiviert *WUS* die Transkription sowohl von *CLV3* als auch von *DRN*. Ein denkbare Szenario in *pWUS:ROCK2* Pflanzen wäre, dass das übermäßig starke Cytokininsignal im OZ zu einer Überaktivierung von *WUS* führt. Der Transkriptionsfaktor würde dann in den Stammzellen wiederum die Überaktivierung von *CLV3* und *DRN* bewirken, was zur Ausbildung eines *pCLV3:DRN*-ähnlichen Phänotyps führen könnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Phänotyp von *pWUS:ROCK2* Pflanzen bisher wenig verstanden ist. Zukünftige Schritte zur Untersuchung dieser Pflanzen beinhalten die Analyse des Auxinstatus im SAM, die Manipulation der Zellteilungsrate und In-situ-Hybridisierungen mit *CLV3*-, *WUS*- und *DRN*-Sonden.

#### 4.4 Die Veränderung des Cytokininstatus in der *CLV1*-Domäne

Die Expression domäne von *CLV1* definiert keine eigene funktionale Zone im SAM, wie es bei *WUS* und *CLV3* der Fall ist. *CLV1* ist in einem Bereich aktiv, der das gesamte OZ beinhaltet, sowie Teile der Stammzellendomäne und der inneren PZ. In diesen drei Bereichen agiert Cytokinin vermutlich auf sehr unterschiedliche Weise. Die bisher bekannten Aspekte der Hormonwirkung in Stammzellen und OZ wurden bereits weiter oben besprochen. Über eine Funktion von Cytokinin speziell in der inneren PZ ist nichts bekannt. Eine Aktivität ist jedoch wahrscheinlich, da in dem Bereich die Transkription aller drei Cytokininrezeptoren sowie verschiedener A-Typ *ARRs* nachgewiesen wurde (Leibfried *et al.* 2005; Mähönen *et al.* 2006b; Zhao *et al.* 2010).

*CLV1* ist nicht nur im SAM aktiv. Analysen mit Promotor:*GFP/GUS* Reporterkonstrukten wiesen *pCLV1*-Aktivität im Phloem und Kambium des Hypokotyls und der Kotyledonen nach (An *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2005). Der eFP Browser, der zur Analyse von Genaktivitäten auf verschiedene Microarraydatensätze zurückgreift (Winter *et al.* 2007), zeigt *CLV1*-Expression in Blättern, der Sprossachse und dem Wurzelsystem an.



#### 4.4.1 Absenkung des Cytokininstatus in der *CLVI*-Domäne

##### *Die Wirkung des pCLVI:CKX1 Transgens*

*pCLVI:CKX1* exprimierende Pflanzen (Abbildung 17B) erinnern mit ihren kleinen Rosetten, den dünnen Stängeln und der verlangsamten Entwicklung an cytokinindefiziente *p35S:CKX* oder *p35S:ARR1-SRDX* Pflanzen (Werner *et al.* 2003; Heyl *et al.* 2008; Holst 2009). Das Meristem von *p35S:CKX1* Pflanzen ist um ca. 90 % kleiner als das des Wildtyps (Werner *et al.* 2003; Bartrina *et al.* 2011). REM-Aufnahmen zeigten, dass auch das SAM von *pCLVI:CKX1* Pflanzen verkleinert ist. Es ist ca. halb so groß wie das des Wildtyps (Sturm, Masterarbeit, unveröffentlicht). Das kleinere SAM von *pCLVI:CKX1* Pflanzen könnte für die dünneren Sprossachsen mit verantwortlich sein, da es weniger Ausgangszellen für die Sprossentwicklung zur Verfügung stellt als das Meristem von Wildtyppflanzen. Die Hauptursache für die dünnere Sprossachse ist jedoch eher in der Aktivität von transgenem *CKX1* im Kambium des Leitgewebes zu suchen, da sich Cytokininmangel in diesem Gewebe negativ auf das Dickenwachstum auswirkt (Nieminen *et al.* 2008). Auch die kleineren Blätter lassen sich durch die ektopische Aktivität von *CKX1* im Blattleitgewebe erklären. Vermutlich ist wie bei *p35S:CKX* Pflanzen (Werner *et al.* 2003) die Zellteilungsaktivität im Blatt eingeschränkt.

Weder *pWUS:CKX1* noch *pCLV3:CKX1* Pflanzen entwickelten einen Phänotyp. Warum sind dagegen *pCLVI:CKX1* Pflanzen phänotypisch verändert? Wie oben erwähnt könnte ein Großteil der phänotypischen Aspekte auf die Aktivität des *CLVI* Promotors im Leitgewebe zurückzuführen sein. Das trifft jedoch nicht auf den SAM-Phänotyp zu, der wahrscheinlich ausschließlich durch die meristematische *pCLVI*-Aktivität bedingt wird. Die Expressionsdomäne von *CLVI* im SAM ist größer als die von *WUS* und *CLV3*, weswegen in *pCLVI:CKX1* Pflanzen mehr Zellen *CKX1* exprimieren als in *pWUS/pCLV3:CKX1* Pflanzen. Der cytokinindefiziente SAM-Bereich könnte also so groß sein, dass der Hormonmangel von den umliegenden Zellen nicht mehr ausgeglichen werden kann. Das wirkt sich auf die Aktivität des SAM aus. Andere Erklärungen beziehen die Bedeutung der betroffenen SAM-Domänen mit ein. Vielleicht spielt Cytokinin in der inneren PZ eine größere Rolle als bisher angenommen. Um dies genauer zu erforschen, könnte *CKX1* mit einem Promotor kombiniert werden, der spezifisch in der PZ aktiv ist. Möglicherweise ist jedoch nicht der verringerte Cytokiningehalt in der PZ für den veränderten Phänotyp entscheidend, sondern die gleichzeitige Absenkung des Cytokiningehalts in OZ und den direkt daran angrenzenden Stammzellen. Es wäre daher interessant, *pCLV3:CKX1 pWUS:CKX1* doppelt transgene Pflanzen zu erzeugen, um sie mit *pCLVI:CKX1* Pflanzen zu vergleichen.

##### *Die Wirkung des pCLVI:ARR1-SRDX Transgens*

*pCLVI:ARR1-SRDX* Pflanzen sind *pCLVI:CKX1* Pflanzen insofern ähnlich, dass sie ebenfalls kleiner sind als der Wildtyp, dünnere Sprosse und kleinere Blätter bilden und ihr Wachstum verlangsamt ist (letzteres allerdings viel stärker als bei *pCLVI:CKX1* Pflanzen). Der Verlust der Apikaldominanz wurde jedoch nur bei den *pCLVI:ARR1-SRDX* Pflanzen beobachtet (Abbildung 18B). Bevor diese

beginnen, mehrere Infloreszenzprosse gleichzeitig zu bilden, entwickeln sie buschige Rosetten mit vielen Seitenrosetten, was für einen Verlust des vegetativen Hauptmeristems und möglicherweise auch einiger Seitenmeristeme spricht. Beobachtungen bei *pCLVI:ARR1-SRDX* Pflanzen, die auf Agarplatten mit Kanamycin angezogen und nach zwei Wochen auf Erde umgesetzt wurden, unterstützen diese Hypothese. So konnte drei Wochen nach der Kanamycinselektion bei ca. 30 % der Pflanzen tatsächlich ein Wachstumsstopp der Hauptrosette und das Auswachsen von mehreren Seitenrosetten beobachtet werden. Bei Pflanzen, die direkt auf Erde angezogen wurden, war dies dagegen nicht direkt sichtbar. Wahrscheinlich tritt der Meristemverlust bei Kanamycin-selektierten Pflanzen aufgrund des durch das Antibiotikum hervorgerufenen Stresses früher auf und wird dadurch früher und deutlicher sichtbar. Eine direkte Folge des wiederholten SAM-Stopps ist die Verzögerung der Entwicklung. *pCLVI:ARR1-SRDX* Pflanzen öffneten ihre erste Blüte ca. 12 Tage nach dem Wildtyp, *pCLVI:CKX1* Pflanzen waren dagegen nur wenig (ca. 1 – 3 Tage) verspätet.

Ein möglicher Grund für den wiederholten Stopp der vegetativen Meristeme von *pCLVI:ARR1-SRDX* Pflanzen könnte die geringe SAM-Größe sein. Die Infloreszenzmeristeme der *pCLVI:ARR1-SRDX* Pflanzen sind weniger als halb so groß wie Wildtypmeristeme (Sturm, Masterarbeit, unveröffentlicht), was allerdings auch bei *pCLVI:CKX1* Pflanzen zutrifft, die ihr Hauptmeristem erhalten. Die Größe der Infloreszenzmeristeme lässt jedoch nicht zwingend auf die Größe der vegetativen Meristeme rückschließen. Die vegetativen Meristeme von *Arabidopsis* sind kleiner als die Infloreszenzmeristeme und möglicherweise sind erstere bei *pCLVI:ARR1-SRDX* Pflanzen kleiner als bei *pCLVI:CKX1* Pflanzen. Kleine Meristeme reagieren womöglich anders und empfindlicher auf Veränderungen, weshalb sie eher ihre Aktivität einstellen könnten als große Meristeme. Bei *p35S:CKX1* Pflanzen, die extrem kleine Sprossmeristeme bilden, wurde gelegentlich beobachtet, dass im vegetativen Stadium das Wachstum eingestellt wurde (Werner *et al.* 2003). Dies könnte wie bei den *pCLVI:ARR1-SRDX* Pflanzen auf die Empfindlichkeit der kleinen Meristeme zurückzuführen sein.

Das ungleiche Aussehen der *pCLVI:ARR1-SRDX* und *pCLV:CKX1* Pflanzen ist auf die unterschiedliche Funktionsweise von *CKX1* und *ARR1-SRDX* zurückzuführen. In *pCLVI:CKX1* Pflanzen besteht die Möglichkeit, dass an den Rändern des *CLVI*-Expressionsbereichs (sowohl im SAM als auch in allen anderen Pflanzenteilen) Cytokinin aus benachbarten Zellen einströmen und auf einem niedrigen Niveau die Signaltransduktion induzieren kann, bevor es durch *CKX1* abgebaut wird. Aufgrund seiner Substratpräferenzen (Galuszka *et al.* 2007) ist *CKX1* möglicherweise nicht in der Lage, alle Cytokinine gleich schnell abzubauen, wodurch eine Restaktivität von Cytokinin im *CLVI*-Expressionsbereich vorhanden sein könnte. Beides würde den Effekt des Cytokininmangels abschwächen. In *pCLVI:ARR1-SRDX* Pflanzen bestehen diese Ausgleichsmöglichkeiten nicht, da Zellen am Rand der *CLVI*-Domäne genauso insensitiv gegenüber Cytokinin sind wie im Zentrum der Domäne und auch die Signale von langsamer abgebauten Cytokinin blockiert werden. Der Cytokininmangel wäre dadurch stärker ausgeprägt als bei Pflanzen mit *CKX* Transgen.

#### 4.4.2 Erhöhung des Cytokininstatus in der *CLV1*-Domäne

*pCLV1:ROCK2* Primärtransformanten starben entweder nach der Bildung einiger winziger Rosettenblätter oder sie wuchsen zu kleinen Pflanzen mit krummen Sprossen und schmalen, verdrehten oder eingerollten Blättern heran (Abbildung 19D). Die Pflanzen blühten normal, teilweise waren am Sprossapex aber mehr Knospen vorhanden als beim Wildtyp. Dadurch war bei manchen Pflanzen das Meristem im Zentrum der Infloreszenz sichtbar (ähnlich wie bei *ckx3 ckx5* oder *ahp6* Pflanzen, s. Abbildung 7A). *pCLV1:ROCK2* Pflanzen haben keine Ähnlichkeit mit *pWUS:ROCK2* Pflanzen, erinnern jedoch mit der verbreiterten Infloreszenz an *pCLV3:ROCK2* Pflanzen. Diese Ähnlichkeit ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der *CLV1* Promotor in der untersten Reihe der Stammzellen aktiv ist, *ROCK2* daher auch in der *CLV3*-Domäne exprimiert wird. Über mögliche Ähnlichkeiten in der SAM-Morphologie kann bislang keine Aussage getroffen werden, da die Meristeme der *pCLV1:ROCK2* Pflanzen noch nicht genauer untersucht worden sind. Die Aktivität von *ROCK2* in der inneren PZ und in den Stammzellen könnte der Grund sein, warum der bei *pWUS:ROCK2* Pflanzen beobachtete Phänotyp eines kugelförmigen Meristems nicht auftritt. In einem Computermodell zeichnete sich das OZ durch eine scharf abgegrenzte hohe Cytokininsensitivität aus (Gordon *et al.* 2009). Diese Abgrenzung ermöglicht laut Modell eine starke Aktivierung von *WUS* ausschließlich in den Zellen der OZ. In *pCLV1:ROCK2* Pflanzen ist zwar einerseits das Cytokininsignal im OZ verstärkt (was alleine zu extrem vergrößerten Sprossapex wie bei *pWUS:ROCK2* Pflanzen führen würde), andererseits sind jedoch auch die umgebenden Zellen cytokininaktiv. Dadurch könnte der Unterschied zwischen OZ und benachbartem Gewebe geringer ausfallen und die starke Aktivierung von *WUS* verhindert werden.

Eine andere Erklärung für das Ausbleiben eines starken Meristemphänotyps wie bei *pWUS:ROCK2* Pflanzen könnte eine Autoregulation des Transgens sein. Die Aktivität von *CLV1* wird im SAM durch Cytokinin negativ reguliert (Lindsay *et al.* 2006). In *pCLV1:ROCK2* Pflanzen wirkt *ROCK2* demzufolge hemmend auf seine eigene Transkription, wodurch möglicherweise keine starke Expression des Transgens zustande kommen kann und die Pflanze nicht so stark beeinflusst wird.

Der auffällige Blattphänotyp der *pCLV1:ROCK2* Pflanzen ist vermutlich auf die Aktivität des *CLV1* Promotors in den Blättern zurückzuführen. Blattspezifische Überproduktion von Cytokinin wurde in der Vergangenheit nur unter der Kontrolle eines seneszenzassoziierten Promotors durchgeführt (Gan und Amasino 1995). Die Auswirkungen eines spezifisch erhöhten Cytokininstatus während der gesamten Blattentwicklung wurden dagegen noch nicht untersucht. Die verdrehten Blätter erinnern an Pflanzen, die in der Expression verschiedener *HD-ZIPIII* Transkriptionsfaktorgene, zu denen auch *REV* gehört, beeinträchtigt waren (z.B. Zhou *et al.* 2007). Nachdem bereits einige Aspekte des *pCLV3:ROCK2* Phänotyps an *rev* Mutanten erinnerten, liefert der Blattphänotyp der *pCLV1:ROCK2* Pflanzen einen weiteren Hinweis, dass Cytokinin die Expression von *REV* und ggf. verwandten Transkriptionsfaktoren negativ beeinflussen könnte.

Bei manchen *pCLV1:ROCK2* Linien wurde nach dem Übergang von der T<sub>2</sub>- zur T<sub>3</sub>-Generation ein neuer Phänotyp beobachtet (Abbildung 19C). Die Blattrosette war fast doppelt so groß wie die des Wildtyps und die Apikaldominanz war stark reduziert. Diese Veränderung ist wahrscheinlich in einer Stilllegung (englisch: *silencing*) des Transgens begründet. Es ist bekannt, dass transkriptionale oder posttranskriptionale Mechanismen die Expression von Transgenen reduzieren können (Fagard und Vaucheret 2000). Für die *pCLV1:ROCK2* Pflanzen könnte das folgendes bedeuten: Das durch ROCK2 verursachte konstitutive Cytokininsignal ruft vermutlich je nach Expressionsstärke einen unterschiedlichen Phänotyp hervor. Ein starkes ROCK2-bedingtes konstitutives Cytokininsignal im Leitgewebe von Sprossachse und Blättern beeinträchtigt vermutlich die Anlage und Entwicklung der Blätter und des gesamten Sprosses in einer negativen Weise. Die weitgehende (aber nicht vollständige) Stilllegung des Transgens würde eine abgeschwächte Expression von ROCK2 ermöglichen. Das dadurch entstehende schwache konstitutive Cytokininsignal könnte nun einen gegenteiligen Effekt erzielen und das Wachstum und die Zellteilung fördern, ohne die Entwicklung der Pflanze zu stören. Ähnliches wurde bereits von Ferreira und Kieber (2005) in Bezug auf das Wurzelwachstum postuliert. Die beiden Autoren diskutierten, dass eine Verstärkung der Cytokininsignaltransduktion negativ auf das Wurzelwachstum wirkt und eine schwache Reduktion der Cytokininsignaltransduktion dagegen selbiges begünstigt. Wird das Cytokininsignal jedoch über einen Grenzwert hinaus reduziert, wird das Wurzelwachstum nicht mehr positiv sondern stark negativ beeinflusst.

#### **4.5 Abregulation von *CKX3* und *CKX5* im Sprossapex von *Brassica napus***

Der vielversprechende Ertragsphänotyp von Arabidopsis *ckx3 ckx5* Doppelmutanten (Bartrina *et al.* 2011) war Ausgangspunkt für das Brassiceteilprojekt. Ziel war es, die Transkriptmenge der orthologen *BnaCKX3* und *BnaCKX5* Gene von Raps zu reduzieren und die phänotypischen Auswirkungen zu untersuchen.

Im Genom von *B. rapa* wurden bislang die Sequenzen von zwölf *CKX* Genen identifiziert (Wang *et al.* 2011). Darunter sind Orthologe aller sieben Arabidopsis *CKX* Gene (Tabelle 14). Orthologe von *BraCKX4*, *BraCKX5* und *BraCKX6* sind mit je einer Genkopie vorhanden, von *BraCKX2*, *BraCKX3* und *BraCKX7* gibt es je zwei paraloge Kopien und von *BraCKX1* drei. Die *BraCKX* Genfamilie spiegelt damit die Evolutionsgeschichte des Brassicagenoms wieder. Seit der Trennung von der Arabidopsislinie erfuhr die Brassicalinie eine Verdreifachung ihres Genoms (Schmidt *et al.* 2001; Lysak *et al.* 2005), wodurch wahrscheinlich die drei *BraCKX1*-Kopien entstanden sind. Im Lauf der Zeit wurde das Genom der Brassicalinie neu strukturiert und große DNA-Abschnitte fielen weg, was erklärt, warum von den anderen *CKX* Orthologen jeweils nur eine oder zwei Kopien vorhanden sind.

Als allotetraploide Pflanze enthält das Rapsgenom sowohl die Gene von *B. rapa*, als auch von *B. oleracea* (U 1935). Da die beiden Elternarten eng verwandt sind, kann man davon ausgehen, dass das

*B. oleracea* Genom gleich viele *CKX*-Kopien enthält wie das *B. rapa* Genom, Raps also doppelt so viele *CKX* Gene enthält wie *B. rapa*. Wie die Sequenzen der Bayer CropScience AG zeigten, ist dies bei den *BnaCKX3* und *BnaCKX5* Genen von Raps tatsächlich der Fall. Die Untersuchung der *BnaCKX3* und *BnaCKX5* Sequenzen ergab, dass die Exon-Intron-Struktur sowie die Proteinlänge im Vergleich zu den Arabidopsisorthologen erhalten geblieben sind. Die kodierenden Genbereiche der jeweiligen Arabidopsis- und Rapsorthologe stimmen zu ca. 88 % überein, die Proteinsequenzen sind sogar bis zu 92 % identisch. Die große Ähnlichkeit der Orthologe lässt vermuten, dass auch die Genfunktionen von *CKX3* und *CKX5* in Arabidopsis und Raps ähnlich geblieben sind. Die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierungen (Abbildung 28) unterstützen diese Vermutung, da *BnaCKX3* und *BnaCKX5* mRNA ähnlich wie die entsprechenden Arabidopsis mRNAs im SAM und in Gynoecien detektiert wurde. Die funktionelle Homologie der *CKX3* und *CKX5* Gene von Arabidopsis und Raps ist eine der Grundvoraussetzungen dafür, dass die Abregulation der entsprechenden Gene in Raps einen ähnlichen Phänotyp hervorrufen kann wie in Arabidopsis.

Möglicherweise wurde die Expression der *BnaCKX* Gene im Sprossapex durch Züchtung reduziert, so wie es bei *OsCKX2* von Reis der Fall ist (Ashikari *et al.* 2005). Ganz verschwunden ist ihre Aktivität jedoch nicht, wie die In-situ-Hybridisierungen in der Sorte Mozart zeigten. Auch qRT-PCR Untersuchungen wiesen sowohl *BnaCKX3* als auch *BnaCKX5* Transkription in den Infloreszenzapices von Mozart nach und zwar auf einem höheren Niveau als in den weniger ertragsstarken Sorten Kristina und H1. Die stärkere Expression in Mozart könnte allerdings auch ein Artefakt der qRT-PCR sein, das auf die geringe Vergleichbarkeit der verwendeten Proben zurückzuführen ist (Demidenko und Penin 2012). Ausgangsmaterial für die RNA-Proben waren Sprossapices von Rapspflanzen, die beim Sichtbarwerden der ersten Blütenknospen geerntet und auf 1 cm Länge gekürzt worden waren. Dadurch enthielten die Proben nicht nur das SAM sondern auch eine Vielzahl von Blütenknospen verschiedener Entwicklungsstadien, sowie die Anlagen von Seitenmeristemen. *BnaCKX3* und *BnaCKX5* werden in Blütenknospen besonders stark exprimiert (Schwarz, persönliche Mitteilung). Eine Probe, die eine größere Zahl von jungen Blüten enthält, verfügt damit automatisch über eine höhere Gesamtmenge von *BnaCKX3* und *BnaCKX5* Transkripten. Bei einem Vergleich der Proben war mit bloßem Auge offensichtlich, dass Mozart mehr Blüten anlegt als Kristina und Kristina wiederum mehr Blüten entwickelt als H1. Die Ergebnisse des Transkriptionsvergleichs zwischen den verschiedenen Rapsorten sind damit nicht belastbar. Da Sprossmeristeme sehr klein sind und die Präparation mit hohem Aufwand verbunden ist, ist qRT-PCR möglicherweise nicht die beste Methode, um Vergleiche der Transkriptionsstärke zwischen verschiedenen Rapsorten zu machen. Der Vergleich der Signalstärke bei In-situ-Hybridisierungen oder von Promotor-GFP/GUS Reportern könnte bessere Ergebnisse liefern.

Die qRT-PCR Ergebnisse, anhand derer Wildtyppflanzen mit amiRNA-Linien (beides im Mozarthintergrund) verglichen wurden, sind belastbarer als die Ergebnisse des Sortenvergleichs, da sich die Infloreszenzen dieser Pflanzen nicht so stark voneinander unterscheiden wie die

verschiedenen Rapssorten. Trotzdem sind leichte Unterschiede in der Form und Größe der Proben zu erwarten, da das Transgen (wenn auch nur schwach) auf die Größe und Aktivität der Infloreszenzmeristeme wirkt. Hinzu kommen unvermeidbare leichte Unterschiede bei der Probennahme. Das Ergebnis der qRT-PCR sollte daher nur als Darstellung eines Trends und nicht als absoluter Wert verstanden werden.

Sowohl in der spaltenden  $T_2$ - als auch in der homozygoten  $T_3$ -Generation konnte bei einem Großteil der untersuchten amiRNA-Linien eine Reduktion der *BnaCKX3*- bzw. *BnaCKX5*-Transkriptmenge beobachtet werden. Das Niveau des *BnaCKX3*-Transkripts konnte in den transgenen Linien auf bis zu ca. 23 % der Transkriptmenge vom Wildtyp reduziert werden, *BnaCKX5*-Transkript auf bis zu ca. 34 %. Die z.T. großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Linien mit gleichem Konstrukt kommen wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Insertionsorte und die dadurch bedingten Genableserate zustande. In zwei der untersuchten Linien war die Abregulation von *BnaCKX3* und *BnaCKX5* bis in die homozygote  $T_3$ -Generation stabil, in den anderen Linien verloren die amiRNA-Transgene an Wirkung, was vermutlich auf Stilllegungseffekte zurückzuführen ist.

Möglicherweise kann die Effizienz der amiRNA-Strategie noch optimiert werden. Zum Zeitpunkt des amiRNA-Designs waren keine qualitativ hochwertigen Sequenzen von *BnaCKX* Genen bekannt, weshalb für das Design auf die Sequenzen von *B. rapa* und *B. oleracea* zurückgegriffen wurde. Von den *CKX3* Genen waren nur die *A2*- und die *C2*-Kopien aus Rübsen bzw. Kohl bekannt, die *A1*- und *C1*-Genkopien waren unbekannt. Nach dem Erhalt der *B. napus* Gensequenzen der Bayer CropScience AG zeigte sich, dass beide gegen *BnaCKX3* gerichteten amiRNAs nicht optimal an alle vier *BnaCKX3*-Sequenzen binden können (Tabelle 17). Dies wirkt sich sehr wahrscheinlich negativ auf die Abbaueffektivität aus, so dass nicht alle anvisierten mRNA Sequenzen gleichgut abgebaut werden. Ähnliches trifft auf die *amiRNA 5.2* zu. Die *amiRNA 5.1* bindet dagegen wie vorhergesagt an beide *BnaCKX5*-Kopien und sollte ihre Zielsequenzen sehr effektiv abbauen. Dies trifft in den sieben untersuchten Linien mit einem *5.1*-Transgen jedoch nicht zu, was entweder bedeuten könnte, dass nicht genug Linien untersucht wurden oder die *amiRNA 5.1* trotz aller erfüllter Bedingungen nicht effektiv genug ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass dies bei amiRNAs häufig der Fall ist, weshalb immer mindestens zwei amiRNAs parallel getestet werden sollten (Ossowski *et al.* 2012). Um also einen effektiveren Abbau der *CKX3* und *CKX5* Transkripte zu erreichen, sollten mehrere neue amiRNAs, die alle Zielsequenzen erreichen können, entwickelt und getestet werden.

Die Pflanzen der  $T_1$ -Generation wurden nicht dahingehend untersucht, ob *BnaCKX3* und *BnaCKX5* abreguliert waren. Es wurde bei ca. der Hälfte aller Primärtransformanten ein höherer Ertrag (mehr Schoten, mehr Saatgut, höheres Tausendkorngewicht) gemessen als bei den aus nicht transformierten Hypokotylen regenerierten Kontrollpflanzen. Phänotypen der  $T_1$ -Generation sind grundsätzlich durch Regenerations- und Selektionseffekte beeinflusst und sollten daher kritisch betrachtet werden. Die Häufigkeit der in diesem Fall beobachteten Ertragssteigerung spricht jedoch dafür, dass die amiRNA-Strategie grundsätzlich in der Lage ist, ähnlich wie bei *ckx3 ckx5* Arabidopsispflanzen, positiv auf den

Ertrag zu wirken. In den Folgegenerationen wurde zwar in manchen Linien eine Absenkung des *BnaCKX3*- und *BnaCKX5*-Transkriptniveaus nachgewiesen, eine Steigerung des Ertrags wie in der T<sub>1</sub>-Generation wurde jedoch nie gemessen. Dies könnte einerseits durch Stilllegung des Transgens bedingt sein, andererseits durch andere Gewächshausbedingungen. Tatsächlich wurden die T<sub>1</sub>-Pflanzen in den Gewächshäusern der NPZ Lembke KG kultiviert, die T<sub>2</sub>- und T<sub>3</sub>-Pflanzen dagegen in einem Haus des Instituts für Biologie/Angewandte Genetik der FU Berlin. In den Berliner Gewächshäusern gab es häufig Schwierigkeiten bei der Rapskultur, weshalb die Ergebnisse der Ertragsanalysen nur gering belastbar sind. Zu den Problemen, die im Verlauf dieser Arbeit auftraten, gehörten starker Schädlingsbefall durch Thripse oder Trauermücken, Lichtmangel, extreme Hitze, Überdüngung, Nährstoffmangel, Wassermangel, zu viel Wasser und unbekannte Krankheitserscheinungen (weiße Blattränder). Eine Lieferung von Pflanzen, die einige Wochen bei der NPZ Lembke KG angezogen worden waren, entwickelte sich deutlich besser als Pflanzen, die parallel in Berlin angezogen worden waren. Die Blätter der NPZ-Pflanzen waren nicht ausgebeult, hatten keine weißen Ränder und die Pflanzen blühten früher. Dies spricht dafür, dass die Gewächshausbedingungen in Berlin für Raps optimiert werden sollten, bevor neue Versuche durchgeführt werden. Da Raps eine ausschließlich im Freiland angebaute Pflanze ist, würden Freilandversuche vermutlich noch realistischere Ergebnisse ermöglichen.

Für diese Arbeit wurden nur Pflanzen ausgewertet, die während des Wachstums wenige offensichtliche Schäden erlitten hatten. Trotzdem wurden auch bei diesen Pflanzen häufig taube Schoten und nicht-entwickelte Samen beobachtet, was für suboptimale Wachstumsbedingungen sprechen könnte. Die Schotendefekte wurden sowohl bei den transgenen Pflanzen beobachtet, als auch bei den Kontrollen. Bei letzteren traten die Probleme in einem etwas geringeren Ausmaß auf, was bedeuten könnte, dass auch das Transgen möglicherweise einen negativen Effekt auf die Pollenfertilität oder die Schotenentwicklung hat. Dies müsste unter optimierten Bedingungen genauer untersucht werden.

Ein vielversprechenderes Ergebnis als die Ertragsuntersuchungen lieferten die Meristemaufnahmen mit dem REM (Abbildung 34). Alle drei untersuchten amiRNA-Linien zeigten zumindest die Tendenz, ca. 10 % mehr Primordien anzulegen als die Kontrollpflanzen. Linie #106.29 bildete sogar signifikant 20 % mehr Primordien als der Wildtyp. Ähnliche Beobachtungen waren bei *ckx3 ckx5* Arabidopsispflanzen gemacht worden (Bartrina *et al.* 2011). Trotzdem schlug sich die höhere Meristemaktivität nicht auf den Ertrag der T<sub>3</sub>-Rapspflanzen nieder, was wie bereits erwähnt auch auf die schwierigen Gewächshausbedingungen zurückzuführen sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die bisherigen Ergebnisse nur vorläufig sind und die phänotypische Untersuchung von Rapspflanzen mit reduzierter *BnaCKX3* und *BnaCKX5* Aktivität noch nicht abgeschlossen ist. Die Entwicklung und Transformation besserer amiRNAs sowie die Verbesserung der Kulturbedingungen lassen auf klare Ergebnisse hoffen. Ein alternativer Versuchsansatz zu der bisher verfolgten amiRNA-Strategie ist das TILLING (McCallum *et al.* 2000).

Dabei wird in mutagenisierten Rapspopulationen gezielt nach *BnaCKX3*- bzw. *BnaCKX5*-Mutationen gesucht, die zu einem Verlust der Genaktivität führen. Die Mutationen werden dann nach und nach zusammengekreuzt, so dass letztlich *ckx3 ckx5* Nullmutanten entstehen. Diese Methode ist aufgrund der vielen Genkopien langwierig, hat aber den Vorteil, dass *silencing* oder ein ineffektiver Abbau der Ziel-mRNA vermieden werden. Allerdings können bei Nullmutanten weder Gendosiseffekte noch die Konsequenzen einer gewebespezifischen Abregulation umfassend analysiert werden.



## 5. Zusammenfassung

Pflanzen bilden während ihres gesamten Lebenszyklus immer wieder neue Organe. Die Organe des Sprosses werden vom apikalen Sprossmeristem (SAM) hervorgebracht. Das SAM enthält im Zentrum eine Stammzellengruppe, die durch Teilung beständig undifferenzierte Zellen an die Meristemperipherie abgibt, ohne sich selbst aufzubauchen. An den Meristemrändern werden die abgegebenen Zellen in neu angelegte Organe eingegliedert, wo sie schließlich zu unterschiedlichen Gewebetypen differenzieren. Es besteht ein komplexes Netzwerk aus genetischen Faktoren und Pflanzenhormonen, das das dynamische Gleichgewicht aus Zellteilung-, -erhaltung und -differenzierung kontrolliert. Das Pflanzenhormon Cytokinin spielt bei diesen regulativen Prozessen eine wichtige Rolle, die jedoch nur teilweise verstanden ist.

Die cytokininabbauenden Enzyme CKX3 und CKX5 sind im SAM aktiv. In *ckx3 ckx5* Mutanten sind beide Enzyme inaktiv, was einen Anstieg des Cytokiningehalts im Sprossapex bewirkt. Dies führt zu einer Vergrößerung des SAM und zu einer Steigerung der Produktivität, d.h. die Primordienbildung ist beschleunigt. Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit wurde gezeigt, dass dieser Phänotyp durch das Einkreuzen der *ahp6* Mutation verstärkt werden kann. AHP6 ist ein negativer Regulator der Cytokinintransduktion, der, wie hier durch In-situ-Hybridisierungen nachgewiesen wurde, am Entstehungsort zukünftiger Primordien aktiv ist. Die *ckx3 ckx5 ahp6* Pflanzen bildeten am deutlich vergrößerten Hauptmeristem ca. 40 % mehr Primordien als *ckx3 ckx5* Pflanzen und mehr als doppelt so viele Primordien wie der Wildtyp. Dies schlug sich jedoch nicht in der Zahl der Schoten wieder. Auf die ganze Pflanze bezogen bildeten *ckx3 ckx5 ahp6* Mutanten weniger als halb so viele Schoten wie der Wildtyp, obwohl sie am Hauptspross ca. 15 % mehr Schoten anlegten. Die geringe Gesamtschotenzahl ist auf einen Rückgang der Verzweigungen um fast 80 % zurückzuführen.

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde die Wirkung von Cytokinin in verschiedenen Bereichen des SAM untersucht. Dafür wurden neun verschiedene Promotor-Gen-Konstrukte kloniert, die (nach der Transformation in Arabidopsis) in eng begrenzten Domänen des SAM den Cytokininstatus anheben oder absenken sollten. Dafür wurden drei Promotoren ausgewählt: *pCLV3* ist in den Stammzellen (SZ) aktiv, *pWUS* im organisatorischen Zentrum (OZ) und *pCLV1* in einem größeren Bereich des Meristemzentrums, der sowohl das OZ als auch Teile der Stammzellen und der Peripheren Zone (PZ) umfasst. Die Promotoren wurden mit *CKX1*, *ARR1-SRDX* oder *ROCK2* kombiniert. *CKX1* ist ein Cytokinin abbauendes Enzym, *ARR1-SRDX* hemmt die Cytokinintransduktion und *ROCK2* ist ein konstitutiv aktiver Cytokininrezeptor. Alle neun Konstrukte wurden stabil in Arabidopsis transformiert und die Transkription aller Transgene wurde nachgewiesen.

Die Expression von *pCLV3:CKX1*, *pCLV3:ARR1-SRDX*, *pWUS:CKX1* oder *pWUS:ARR1-SRDX* bewirkte keine Änderung des Phänotyps. Dagegen waren sowohl die *pCLV1:CKX1* als auch die *pCLV1:ARR1-SRDX* Pflanzen deutlich kleiner als der Wildtyp. Diese Phänotypen sind z.T. vermutlich

auf die Aktivität des *pCLV1* Promotors im Leitgewebe von Spross und Blättern zurückzuführen. *pCLV1:ARR1-SRDX* Pflanzen stellen unter Selektionsstress häufig die Aktivität des vegetativen Hauptmeristems ein. Vermutlich geschieht dies auch in nicht-gestressten Pflanzen, da diese buschige Rosetten und eine Vielzahl von gleichzeitig wachsenden Infloreszenzsprossen bilden.

*pCLV1:ROCK2* Pflanzen entwickelten kleine eingerollte Blätter, kurze Infloreszenzspresse und leicht vergrößerte Infloreszenzen. Während die Blattform bzw. die Sprosslänge vermutlich durch die *pCLV1*-Aktivität im Leitgewebe begründet ist, bewirkt das konstitutive Cytokininsignal im SAM, gemessen an der Blütendichte, vermutlich eine Vergrößerung des Sprossapex.

Das konstitutive Cytokininsignal im OZ verursachte in den extremsten Fällen die Bildung eines stark vergrößerten, kugelförmigen Apex, der, abgesehen von wenigen kleinen Blättern, weder in der Lage war, laterale Organe zu bilden, noch in die Länge zu wachsen. Offensichtlich ist bei diesen Pflanzen das Gleichgewicht aus Zellteilung und -differenzierung gestört. Stark exprimierende *pWUS:ROCK2* Pflanzen haben große Ähnlichkeit *pCLV3:DRN* Pflanzen. *DRN* kodiert für einen Transkriptionsfaktor. Es wird vermutet, dass das Gen positiv durch Cytokinin reguliert wird. Möglicherweise wird *DRN* in *pWUS:ROCK2* Pflanzen ektopisch aktiviert.

Die auffälligsten Merkmale der *pCLV3:ROCK2* Pflanzen waren das weitgehende Fehlen von Seitensprossen und das extrem vergrößerte, stark deformierte SAM, das eine Vielzahl von Blütenprimordien anlegte. Das Infloreszenzmeristem bildete sowohl fertile, vergrößerte Blüten, als auch filiformer grüne Organe, die vermutlich missgebildete Blüten waren. Kreuzungsexperimente zeigten, dass der transgene Phänotyp abhängig von *STM* und *WUS* war und durch die *clv3* Mutation verstärkt wurde.

In der Vergangenheit war gezeigt worden, dass *ckx3 ckx5* Arabidopsismutanten mehr Samen bilden können als Wildtyppflanzen. Raps ist eine allotetraploide Nutzpflanze, die nah mit Arabidopsis verwandt ist. Im Genom von Raps existieren vier *CKX3*- und zwei *CKX5*-Kopien. Im dritten Teilprojekt dieser Arbeit wurden transgene Rapspflanzen hergestellt, deren *CKX3* und *CKX5* Transkriptmenge durch die Expression von amiRNAs reduziert war. Obwohl eine leichte Vergrößerung des Infloreszenzmeristems beobachtet wurde, konnte keine Ertragssteigerung festgestellt werden. Im Gegenteil produzierten die transgenen Pflanzen gleichviele oder weniger Samen als die Kontrollpflanzen. Da die Ertragsversuche unter suboptimalen Gewächshausbedingungen durchgeführt wurden, sind diese Ergebnisse jedoch kaum belastbar.

## 6. Summary

Plants initiate new organs throughout their life cycle. The organs of the shoot are produced by the shoot apical meristem (SAM). In its centre, the SAM maintains a group of continuously dividing stem cells (SC) that provide cells for the meristem periphery without using themselves up. At the meristem borders the stem cell descendants are incorporated into organ primordia. In the course of organ development the cells finally differentiate into different tissue types. A complex network of genetic factors and plant hormones controls the dynamic balance of cell division, maintenance and differentiation. The phytohormone cytokinin is involved in these processes, but its function is only partially understood.

The cytokinin degrading enzymes CKX3 and CKX5 are active in the SAM. In the *ckx3 ckx5* mutant the loss of both enzymes causes an elevated cytokinin content in the SAM. This leads to an enlargement of the SAM and an increased rate of primordium initiation. In the first subproject of this work it was shown, that this phenotype is even more pronounced in the *ahp6 ckx3 ckx5* triple mutant. AHP6 is a negative regulator of cytokinin signal transduction. It was confirmed by *in situ* hybridizations that AHP6 is expressed at the position of future primordia. *ckx3 ckx5 ahp6* mutants had an enlarged SAM, producing about 40 % more primordia than the *ckx3 ckx5* mutant and more than twice the number of primordia than the wildtype. Silique number at the main stem was increased by 15 % in triple mutants. Nonetheless overall number of siliques was decreased by more than 50 % when compared to the wildtype, which was due to the low number of lateral branches.

The second subproject was designed to investigate the impact of cytokinin on different regions of the SAM. Nine different promoter-gene constructs were cloned to alter the cytokinin status in specific meristem domains of Arabidopsis. To this end three meristem domain specific promoters were chosen: *pCLV3* is active in the SC, *pWUS* in the organizing centre (OC) and *pCLV1* is expressed in a domain comprising the OC, the lower part of the SC and the inner peripheral zone. Each of the promoters was combined either with *CKX1*, *ARR1-SRDX* or *ROCK2*. CKX1 is a cytokinin degrading enzyme, ARR1-SRDX is a suppressor of cytokinin signalling and ROCK2 is a constitutively active cytokinin receptor. The nine constructs were transformed into Arabidopsis and transcription of all transgenes was confirmed.

Plants expressing *pCLV3:CKX1*, *pCLV3:ARR1-SRDX*, *pWUS:CKX1* or *pWUS:ARR1-SRDX* showed no phenotypic alterations. In contrast, both *pCLV1:CKX1* and *pCLV1:ARR1-SRDX* plants were smaller than the wildtype. To some extent this phenotype is probably due to the activity of the *CLV1* promoter in the vasculature of the stem and leaves. When selected on kanamycin *pCLV1:ARR1-SRDX* plants frequently terminated their vegetative SAM and initiated a great number of lateral rosettes

which gave them a bushy appearance. In non-selected plants the terminated SAM was not readily visible between leaves. However this kind of meristem arrest probably also occurs in non-selected plants, as they also develop bushy rosettes and initiate many inflorescence stems simultaneously.

*pCLV1:ROCK2* had small involute leaves, short crooked inflorescence stems and slightly enlarged inflorescences. Stem length and leaf form were probably caused by the activity of the transgene in the vasculature whereas the enlarged inflorescence apex is possibly due to the constitutive cytokinin signal in the SAM.

The constitutive cytokinin signal in the OC of *pWUS:ROCK2* plants caused a severe phenotype. Transgenic plants only produced a few leaves and never bolted. Instead they formed a small globular shoot covered with trichomes. Obviously the balance between cell proliferation and differentiation was disturbed. *pWUS:ROCK2* plants resembled *pCLV3:DRN* plants. *DRN* encodes a transcription factor and is probably induced by cytokinin. Possibly the *pWUS:ROCK2* transgene causes ectopic expression of the *DRN* gene.

*pCLV3:ROCK2* plants hardly formed lateral branches. The enlarged and distorted SAM initiated a great number of flowers. Flowers were either enlarged or had the shape of green filiform structures lacking floral organs. Crosses with meristem mutants revealed both *STM* and *WUS* to be epistatic to the transgene. In contrast, the *clv3* mutation potentiates the meristematic phenotype.

*ckx3 ckx5* Arabidopsis mutants produce more seeds than wildtype plants. The genome of canola, a polyploid crop plant closely related to Arabidopsis, harbours four *CKX3* and two *CKX5* gene copies. The last subproject of this thesis aimed to reduce the content of *CKX3* and *CKX5* transcript in the canola cultivar Mozart by expression of different amiRNA transgenes. Quantitative real time PCR analysis showed successful down regulation of target gene transcripts in transgenic canola plants. Scanning electron microscope pictures of shoot apices revealed a slight increase of meristem size. In spite of the increased SAM size no increase in seed yield was observed. Instead, amiRNA expressing plants produced less seeds than wildtype plants or the same amount of seeds.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aggarwal, P., Yadav, R.K. und Reddy, G.V. (2010). Identification of novel markers for stem-cell niche of Arabidopsis shoot apex. *Gene Expression Patterns*, 10, 259-264.
- Aichinger, E., Kornet, N., Friedrich, T. und Laux, T. (2012). Plant stem cell niches. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 615-636.
- Aida, M., Ishida, T. und Tasaka, M. (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development*, 126, 1563-1570.
- Alvarez, J.P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z. und Eshed, Y. (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *The Plant Cell*, 18, 1134-1151.
- An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Pineiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C. und Coupland, G. (2004). *CONSTANS* acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development*, 131, 3615-3626.
- Argyros, R.D., Mathews, D.E., Chiang, Y.H., Palmer, C.M., Thibault, D.M., Etheridge, N., Argyros, D.A., Mason, M.G., Kieber, J.J. und Schaller, G.E. (2008). Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *The Plant Cell*, 20, 2102-2116.
- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H. und Matsuoka, M. (2005). Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 309, 741-745.
- Bainbridge, K., Guyomarc'h, S., Bayer, E., Swarup, R., Bennett, M., Mandel, T. und Kuhlemeier, C. (2008). Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes and Development*, 22, 810-823.
- Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q.-W. und Chua, N.-H. (2001). Overexpression of Arabidopsis *ESR1* induces initiation of shoot regeneration. *The Plant Cell*, 13, 2609-2618.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-297.
- Barton, M.K. und Poethig, R.S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development*, 119, 823-831.
- Barton, M.K. (2010). Twenty years on: The inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Developmental Biology*, 341, 95-113.
- Bartrina, I. (2006). Molekulare Charakterisierung von *ckx* Insertionsmutanten und Suppressormutanten des Cytokinindefizitsyndroms in *Arabidopsis thaliana*. (Berlin: Freie Universität)
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T. und Schmülling, T. (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23, 69-80.
- Bäurle, I. und Laux, T. (2003). Apical meristems: the plant's fountain of youth. *BioEssays*, 25, 961-970.
- Bernard, P. und Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology*, 226, 735-745.
- Besnard, F., Vernoux, T. und Hamant, O. (2011). Organogenesis from stem cells in *planta*: multiple feedback loops integrating molecular and mechanical signals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2885-2906.
- Bilyeu, K.D., Cole, J.L., Laskey, J.G., Riekhof, W.R., Esparza, T.J., Kramer, M.D. und Morris, R.O. (2001). Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology*, 125, 378-386.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, 1513-1523.

- Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., Benková, E., Mähönen, Ari P. und Helariutta, Y. (2011a). A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology*, 21, 917-926.
- Bishopp, A., Lehesranta, S., Vatén, A., Help, H., El-Showk, S., Scheres, B., Helariutta, K., Mähönen, Ari P., Sakakibara, H. und Helariutta, Y. (2011b). Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Current Biology*, 21, 927-932.
- Blackwell, J.R. und Horgan, R. (1993). Cloned *Agrobacterium tumefaciens IPT1* gene product, DMAPP: AMP isopentenyl transferase. *Phytochemistry*, 34, 1477-1481.
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N.D. und Satiat-Jeunemaitre, B. (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy*, 214, 159-173.
- Bonetta, D., Bayliss, P., Sun, S., Sage, T. und McCourt, P. (2000). Farnesylation is involved in meristem organization in *Arabidopsis*. *Planta*, 211, 182-190.
- Boscá, S., Knauer, S. und Laux, T. (2011). Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. *Frontiers in Plant Science*, 2.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R. und Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13, 1499-1510.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M. und Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science*, 289, 617-619.
- Brand, U., Hobe, M. und Simon, R. (2001). Functional domains in plant shoot meristems. *BioEssays*, 23, 134-141.
- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M. und Simon, R. (2002). Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129, 565-575.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L. und Schmülling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, 44, 314-333.
- Brewer, P.B., Heisler, M.G., Hejatko, J., Friml, J. und Benkova, E. (2006). In-situ hybridization for mRNA detection in *Arabidopsis* tissue sections. *Nature Protocols*, 1, 1462-1467.
- Brownlee, B.G., Hall, R.H. und Whitty, C.D. (1975). 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl)adenine. *Can J Biochem*, 53, 37-41.
- Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J. und Palme, K. (1993). Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262, 1051-1054.
- Buechel, S., Leibfried, A., To, J.P.C., Zhao, Z., Andersen, S.U., Kieber, J.J. und Lohmann, J.U. (2010). Role of A-type ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS in meristem maintenance and regeneration. *European Journal of Cell Biology*, 89, 279-284.
- Bürkle, L., Cedzich, A., Dopke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kuhn, C. und Frommer, W.B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 34, 13-26.
- Busch, W., Miotk, A., Ariel, F.D., Zhao, Z., Forner, J., Daum, G., Suzuki, T., Schuster, C., Schultheiss, S.J., Leibfried, A., Haubeiß, S., Ha, N., Chan, R.L. und Lohmann, J.U. (2010). Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Developmental Cell*, 18, 841-853.
- Calvin, N.M. und Hanawalt, P.C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *Journal of Bacteriology*, 170, 2796-2801.
- Carles, C.C. und Fletcher, J.C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends in Plant Science*, 8, 394-401.
- Chaudhury, A.M., Letham, S., Craig, S. und Dennis, E.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, 907-916.
- Chen, Q., Atkinson, A., Otsuga, D., Christensen, T., Reynolds, L. und Drews, G.N. (1999). The *Arabidopsis* *FILAMENTOUS FLOWER* gene is required for flower formation. *Development*, 126, 2715-2726.

- Chen, X., Truksa, M., Shah, S. und Weselake, R.J. (2010). A survey of quantitative real-time polymerase chain reaction internal reference genes for expression studies in *Brassica napus*. *Analytical Biochemistry*, 405, 138-140.
- Chickarmane, V.S., Gordon, S.P., Tarr, P.T., Heisler, M.G. und Meyerowitz, E.M. (2012). Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 4002-4007.
- Chin-Atkins, A.N., Craig, S., Hocart, C.H., Dennis, E.S. und Chaudhury, A.M. (1996). Increased endogenous cytokinin in the Arabidopsis *ampl* mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta*, 198, 549-556.
- Chiu, W.-H., Chandler, J., Cnops, G., Lijsebettens, M. und Werr, W. (2007). Mutations in the *TORNADO2* gene affect cellular decisions in the peripheral zone of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 63, 731-744.
- Choi, J., Huh, S.U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.H. und Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 19, 284-295.
- Clark, S.E., Running, M.P. und Meyerowitz, E.M. (1993). *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development*, 119, 397-418.
- Clark, S.E., Running, M.P. und Meyerowitz, E.M. (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development*, 121, 2057-2067.
- Clark, S.E., Williams, R.W. und Meyerowitz, E.M. (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell*, 89, 575-585.
- Clark, S.E. (2001). Cell signalling at the shoot meristem. *nature reviews molecular cell biology*, 2, 276-284.
- Clough, S.J. und Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16, 735-743.
- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacquard, A., Lejeune, P., van Onckelen, H., Périlleux, C. und Bernier, G. (2003). Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2511-2517.
- Cutcliffe, J.W., Hellmann, E., Heyl, A. und Rashotte, A.M. (2011). CRFs form protein-protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in Arabidopsis via the CRF domain. *Journal of Experimental Botany*, 62, 4995-5002.
- D'Agostino, I.B., Deruere, J. und Kieber, J.J. (2000). Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology*, 124, 1706-1717.
- Davis, A., Hall, A., Millar, A., Darrah, C. und Davis, S. (2009). Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods*, 5, 3.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P. und Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, 17, 678-682.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S. und Sabatini, S. (2008a). Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 23-27.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P. und Sabatini, S. (2008b). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322, 1380-1384.
- Demidenko, N.V. und Penin, A.A. (2012). Comparative analysis of gene expression level by quantitative real-time PCR has limited application in objects with different morphology. *PLoS ONE*, 7, e38161.
- Deng, Y., Dong, H., Mu, J., Ren, B., Zheng, B., Ji, Z., Yang, W.-C., Liang, Y. und Zuo, J. (2010). Arabidopsis histidine kinase *CKII* acts upstream of *HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEINS* to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *The Plant Cell*, 22, 1232-1248.
- Dewitte, W., Scofield, S., Alcasabas, A.A., Maughan, S.C., Menges, M., Braun, N., Collins, C., Nieuwland, J., Prinsen, E., Sundaresan, V. und Murray, J.A.H. (2007). Arabidopsis *CYCD3* D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 14537-14542.

- Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q., Gerentes, D., Perez, P. und Smyth, D.R. (1996). AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *The Plant Cell*, 8, 155-168.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z. und Laux, T. (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *The Plant Journal*, 10, 967-979.
- ENS-Lyon. (2012). [www.ens-lyon.fr/rdp/sice/](http://www.ens-lyon.fr/rdp/sice/)
- Estelle, M.A. und Somerville, C. (1987). Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Molecular and General Genetics MGG*, 206, 200-206.
- Estruch, J.J., Granell, A., Hansen, G., Prinsen, E., Redig, P., Van Onckelen, H., Schwarz-Sommer, Z., Sommer, H. und Spena, A. (1993). Floral development and expression of floral homeotic genes are influenced by cytokinins. *The Plant Journal*, 4, 379-384.
- Fagard, M. und Vaucheret, H. (2000). (Trans)gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 51, 167-194.
- Falk, A. und Rask, L. (1995). Expression of a zeatin-*O*-glucoside-degrading beta-glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 108, 1369-1377.
- FAO. (2012). [faostat3.fao.org](http://faostat3.fao.org) (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- Ferreira, F.J. und Kieber, J.J. (2005). Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 518-525.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R. und Meyerowitz, E.M. (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in Arabidopsis shoot meristems. *Science*, 283, 1911-1914.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. und Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *nature*, 426, 147-153.
- Furner, I., J. und Pumfrey, J.E. (1992). Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 115, 755-764.
- Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmülling, T. und Frébort, I. (2007). Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 255-267.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. und Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science*, 282, 2226-2230.
- Gan, S. und Amasino, R.M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270, 1986-1988.
- Giulini, A., Wang, J. und Jackson, D. (2004). Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue ABPHYL1. *nature*, 430, 1031-1034.
- Golovko, A., Sitbon, F., Tillberg, E. und Nicander, B. (2002). Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 49, 161-169.
- Gordon, S.P., Chickarmane, V.S., Ohno, C. und Meyerowitz, E.M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 16529-16534.
- Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y. und Traas, J. (2004). In vivo analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16, 74-87.
- Greb, T., Clarenz, O., Schäfer, E., Müller, D., Herrero, R., Schmitz, G. und Theres, K. (2003). Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes and Development*, 17, 1175-1187.
- Groß-Hardt, R., Lenhard, M. und Laux, T. (2002). *WUSCHEL* signaling functions in interregional communication during Arabidopsis ovule development. *Genes and Development*, 16, 1129-1138.
- Gupta, S.K. und Pratap, A. (2007). History, Origin, and Evolution. In *Advances in Botanical Research*, S. K. Gupta, ed (Academic Press), pp. 1-20.
- Ha, C.M., Jun, J.H., Fletcher, J.C. und Marja, C.P.T. (2010). Shoot apical meristem form and function. In *Current Topics in Developmental Biology* (Academic Press), pp. 103-140.



- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.
- Hardtke, C.S. und Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO Journal*, 17, 1405-1411.
- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S. und Tsiantis, M. (2002). The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Current Biology*, 12, 1557-1565.
- Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A. und Meyerowitz, E.M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Current Biology*, 15, 1899-1911.
- Hewelt, A., Prinsen, E., Schell, J., Vanonckelen, H. und Schmülling, T. (1994). Promoter tagging with a promoterless *IPT* gene leads to cytokinin-induced phenotypic variability in transgenic tobacco plants - implications of gene dosage effects. *The Plant Journal*, 6, 879-891.
- Heyl, A., Ramireddy, E., Brenner, W.G., Riefler, M., Allemeersch, J. und Schmülling, T. (2008). The transcriptional repressor *ARR1-SRDX* suppresses pleiotropic cytokinin activities in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 147, 1380-1395.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M.R. und Kakimoto, T. (2004). *In planta* functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 8821-8826.
- Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2005). Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology*, 138, 196-206.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. und Sakakibara, H. (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Biology*, 59, 75-83.
- Holst, K. (2009). Untersuchung der Rolle der Cytokinine im Primärmetabolismus und bei der Regulierung der sink/source-Verhältnisse in Pflanzen. (Berlin: Freie Universität)
- Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Kieber, J.J. (2006). The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 18, 3073-3087.
- Hwang, I. und Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *nature*, 413, 383-389.
- Hwang, I., Chen, H.C. und Sheen, J. (2002). Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129, 500-515.
- Hwang, I., Sheen, J. und Müller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 353-380.
- Igarashi, D., Izumi, Y., Dokiya, Y., Totsuka, K., Fukusaki, E. und Ohsumi, C. (2009). Reproductive organs regulate leaf nitrogen metabolism mediated by cytokinin signal. *Planta*, 229, 633-644.
- Irish, V.F. und Sussex, I.M. (1992). A fate map of the Arabidopsis embryonic shoot apical meristem. *Development*, 115, 745-753.
- Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A. und Mizuno, T. (2008). Three type-B response regulators, *ARR1*, *ARR10* and *ARR12*, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 49, 47-57.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P. und Tsiantis, M. (2005). *KNOX* action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology*, 15, 1560-1565.
- Jeon, J., Kim, N.Y., Kim, S., Kang, N.Y., Novak, O., Ku, S.J., Cho, C., Lee, D.J., Lee, E.J., Strnad, M. und Kim, J. (2010). A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 23371-23386.
- Jeong, S., Trotochaud, A.E. und Clark, S.E. (1999). The Arabidopsis *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *The Plant Cell*, 11, 1925-1934.

- Johnston, J.S., Pepper, A.E., Hall, A.E., Chen, Z.J., Hodnett, G., Drabek, J., Lopez, R. und Price, H.J. (2005). Evolution of genome size in Brassicaceae. *Annals of Botany*, 95, 229-235.
- Kakimoto, T. (1996). CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 274, 982-985.
- Kakimoto, T. (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, 42, 677-685.
- Kamada-Nobusada, T. und Sakakibara, H. (2009). Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 70, 444-449.
- Kaneko, M., Itoh, H., Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M. und Matsuoka, M. (2003). Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? *The Plant Journal*, 35, 104-115.
- Karimi, M., Inze, D. und Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7, 193-195.
- Karimi, M., De Meyer, B. und Hilson, P. (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science*, 10, 103-105.
- Karimi, M., Bleys, A., Vanderhaeghen, R. und Hilson, P. (2007). Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiology*, 145, 1183-1191.
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. und Sakakibara, H. (2004). Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 14049-14054.
- Kaya, H., Shibahara, K.-i., Taoka, K.-i., Iwabuchi, M., Stillman, B. und Araki, T. (2001). *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*, 104, 131-142.
- Kayes, J.M. und Clark, S.E. (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development*, 125, 3843-3851.
- Keller, T., Abbott, J., Moritz, T. und Doerner, P. (2006). *Arabidopsis REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1* controls a leaf axil stem cell niche and modulates vegetative development. *The Plant Cell*, 18, 598-611.
- Kiba, T., Aoki, K., Sakakibara, H. und Mizuno, T. (2004). *Arabidopsis* response regulator, *ARR22*, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant. *Plant and Cell Physiology*, 45, 1063-1077.
- Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H. und Mizuno, T. (2005). Combinatorial microarray analysis revealing *Arabidopsis* genes implicated in cytokinin responses through the His->Asp phosphorelay circuitry. *Plant and Cell Physiology*, 46, 339-355.
- Kidner, C. und Timmermans, M. (2006). In situ hybridisation as a tool to study the role of miRNAs in plant development. In *MicroRNA protocols*, S.-Y. Ying, ed (Humana Press), pp. 159-179.
- Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R.d., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H. und Sawa, S. (2010). RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development*, 137, 3911-3920.
- Kirch, T., Simon, R., Grunewald, M. und Werr, W. (2003). The *DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* gene of *Arabidopsis* acts in the control of meristem cell fate and lateral organ development. *The Plant Cell*, 15, 694-705.
- Köllmer, I. (2009). Funktionelle Charakterisierung von *CKX7* und cytokininregulierten Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana*. (Berlin: FU)
- Koncz, C. und Schell, J. (1986). The promoter of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics*, 204, 383-396.
- Kondo, T., Sawa, S., Kinoshita, A., Mizuno, S., Kakimoto, T., Fukuda, H. und Sakagami, Y. (2006). A plant peptide encoded by *CLV3* identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science*, 313, 845-848.
- Krall, L., Raschke, M., Zenk, M.H. und Baron, C. (2002). The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Letters*, 527, 315-318.
- Krizek, B.A. und Fletcher, J.C. (2005). Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide. *Nature Reviews Genetics*, 6, 688-698.

- Kudo, T., Kiba, T. und Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 53-60.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. und Kyojuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *nature*, 445, 652-655.
- Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K. und Sakakibara, H. (2009). Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21, 3152-3169.
- Lagercrantz, U. (1998). Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics*, 150, 1217-1228.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M.B., Offringa, R., Graham, N., Doumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T. und Bennett, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell*, 19, 3889-3900.
- Lau, S., Slane, D., Herud, O., Kong, J. und Jürgens, G. (2012). Early embryogenesis in flowering plants: Setting up the basic body pattern. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 483-506.
- Laufs, P., Dockx, J., Kronenberger, J. und Traas, J. (1998). *MGOUN1* and *MGOUN2*: Two genes required for primordium initiation at the shoot apical and floral meristems in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 125, 1253-1260.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J. und Jürgens, G. (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development*, 122, 87-96.
- Laux, T., Würschum, T. und Breunigner, H. (2004). Genetic regulation of embryonic pattern formation. *The Plant Cell*, 16, 190-202.
- Lee, B.-h., Johnston, R., Yang, Y., Gallavotti, A., Kojima, M., Travencolo, B.A.N., Costa, L.d.F., Sakakibara, H. und Jackson, D. (2009a). Studies of *aberrant phyllotaxy1* mutants of maize indicate complex interactions between auxin and cytokinin signaling in the shoot apical meristem. *Plant Physiology*, 150, 205-216.
- Lee, D.J., Park, J.W., Lee, H.W. und Kim, J. (2009b). Genome-wide analysis of the auxin-responsive transcriptome downstream of *iaa1* and its expression analysis reveal the diversity and complexity of auxin-regulated gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3935-3957.
- Leibfried, A., To, J.P.C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J. und Lohmann, J.U. (2005). *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *nature*, 438, 1172-1175.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jürgens, G. und Laux, T. (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell*, 105, 805-814.
- Lenhard, M. und Laux, T. (2003). Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of *CLAVATA3* and its sequestration by *CLAVATA1*. *Development*, 130, 3163-3173.
- Leyser, O. und Furner, I.J. (1992). Characterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 116, 397-403.
- Li, X.G., Su, Y.H., Zhao, X.Y., Li, W., Gao, X.Q. und Zhang, X.S. (2010). Cytokinin overproduction-caused alteration of flower development is partially mediated by *CUC2* and *CUC3* in Arabidopsis. *Gene*, 450, 109-120.
- Li, Y., Hagen, G. und Guilfoyle, T.J. (1992). Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. *Developmental Biology*, 153, 386-395.
- Lincoln, C., Britton, J.H. und Estelle, M. (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2, 1071-1080.
- Lindsay, D.L. (2006). Cytokinin-induced gene expression in Arabidopsis. (Saskatoon: University of Saskatchewan)
- Lindsay, D.L., Sawhney, V.K. und Bonham-Smith, P.C. (2006). Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporally coincide with altered floral development in Arabidopsis. *Plant Science*, 170, 1111-1117.

- Long, J. und Barton, M.K. (2000). Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Developmental Biology*, 218, 341-353.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I. und Barton, M.K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *nature*, 379, 66-69.
- Long, J.A. und Barton, M.K. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development*, 125, 3027-3035.
- Lysak, M.A., Koch, M.A., Pecinka, A. und Schubert, I. (2005). Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. *Genome Research*, 15, 516-525.
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N. und Helariutta, Y. (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes and Development*, 14, 2938-2943.
- Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Tormakangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T. und Helariutta, Y. (2006a). Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*, 311, 94-98.
- Mähönen, A.P., Higuchi, M., Törmäkangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M.S., Sussman, M.R., Helariutta, Y. und Kakimoto, T. (2006b). Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 16, 1116-1122.
- Malamy, J.E. und Benfey, P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124, 33-44.
- Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., PaYezová, M., Petráek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J. und Benková, E. (2011). Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental Cell*, 21, 796-804.
- Marsch-Martínez, N., Ramos-Cruz, D., Irepan Reyes-Olalde, J., Lozano-Sotomayor, P., Zúñiga-Mayo, V.M. und de Folter, S. (2012). The role of cytokinin during *Arabidopsis* gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *The Plant Journal*, 72, 222-234.
- Mason, M.G., Li, J., Mathews, D.E., Kieber, J.J. und Schaller, G.E. (2004). Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135, 927-937.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Vaclavikova, K., Miyawaki, K. und Kakimoto, T. (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 20027-20031.
- Matsuoka, M., Ichikawa, H., Saito, A., Tada, Y., Fujimura, T. und Kano-Murakami, Y. (1993). Expression of a rice homeobox gene causes altered morphology of transgenic plants. *The Plant Cell*, 5, 1039-1048.
- Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. und Laux, T. (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 95, 805-815.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A. und Henikoff, S. (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology*, 18, 455-457.
- McGaw, B.A. und Horgan, R. (1983). Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase. *Phytochemistry*, 22, 1103-1105.
- Medford, J.I., Horgan, R., El-Sawi, Z. und Klee, H.J. (1989). Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *The Plant Cell*, 1, 403-413.
- Miller, C.O., Skoog, F., Von Saltza, M.H. und Strong, F.M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 1392-1392.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. und Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal*, 37, 128-138.
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G. und Kakimoto, T. (2006). Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 16598-16603.
- Mizukami, Y. und Fischer, R.L. (2000). Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 942-947.

- Mok, D.W.S. und Mok, M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 89.
- Müller, B. und Sheen, J. (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *nature*, 453, 1094-1097.
- Müller, D., Schmitz, G. und Theres, K. (2006). *Blind* homologous *R2R3 Myb* genes control the pattern of lateral meristem initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18, 586-597.
- Müller, D. und Leyser, O. (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany*, 107, 1203-1212.
- Müller, R. (2007). Zur Rolle der Signaltransduktion in der meristematischen Entwicklung von *Arabidopsis thaliana*. (Düsseldorf: Heinrich Heine Universität)
- Müller, R., Bleckmann, A. und Simon, R. (2008). The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *The Plant Cell*, 20, 934-946.
- Nägeli, C.W. (1858). Das Wachstum des Stammes und der Wurzel bei den Gefäßpflanzen und die Anordnung der Gefäßstränge im Stengel. (Leipzig: Wilhelm Engelmann).
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. und Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104, 34-41.
- Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., Tähtiharju, S., Elo, A., Decourteix, M., Ljung, K., Bhalerao, R., Keinonen, K., Albert, V.A. und Helariutta, Y. (2008). Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 20032-20037.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. und Ueguchi, C. (2004). Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16, 1365-1377.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T. und Tran, L.S. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell*, 23, 2169-2183.
- Nogué, F., Grandjean, O., Craig, S., Dennis, S. und Chaudhury, M. (2000). Higher levels of cell proliferation rate and cyclin *CycD3* expression in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regulation*, 32, 275-283.
- O'Brien, T.P., Feder, N. und McCully, M.E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59, 368-373.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y. und Matsubayashi, Y. (2008). *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*, 319, 294.
- Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M. und Matsubayashi, Y. (2009). A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology*, 5, 578-580.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J. und Shimura, Y. (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *The Plant Cell*, 3, 677-684.
- Ossowski, S., Schwab, R. und Weigel, D. (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal*, 53, 674-690.
- Ossowski, S., Fitz, J., Schwab, R., Riester, M. und Weigel, D. (2012). WMD3 - web microRNA designer ([wmd3.weigelworld.org](http://wmd3.weigelworld.org))
- Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M.J., Drews, G.N. und Clark, S.E. (2001). *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *The Plant Journal*, 25, 223-236.
- Paponov, I.A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J.A.H. und Palme, K. (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 1, 321-337.
- Perales, M. und Reddy, G.V. (2012). Stem cell maintenance in shoot apical meristems. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 10-16.
- Petrásek, J. und Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136, 2675-2688.

- Rai, B., Gupta, S.K. und Pratap, A. (2007). Breeding methods. In Rapeseed Breeding, S. K. Gupta, ed (San Diego: Elsevier).
- Raleigh, E.A., Murray, N.E., Revel, H., Blumenthal, R.M., Westaway, D., Reith, A.D., Rigby, P.W., Elhai, J. und Hanahan, D. (1988). McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic Acids Research*, 16, 1563-1575.
- Raleigh, E.A., Elbing, K. und Brent, R. (1989). Selected topics from classical bacterial genetics. In *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: Wiley), pp. 1.4.1-1.4.16.
- Rashotte, A.M., Carson, S.D., To, J.P. und Kieber, J.J. (2003). Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132, 1998-2011.
- Rashotte, A.M., Mason, M.G., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E. und Kieber, J.J. (2006). A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 11081-11085.
- Rashotte, A.M. und Goertzen, L.R. (2010). The CRF domain defines cytokinin response factor proteins in plants. *BMC Plant Biology*, 10, 74.
- Reddy, G.V. und Meyerowitz, E.M. (2005). Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex. *Science*, 310, 663-667.
- Reinhardt, D., Mandel, T. und Kuhlemeier, C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *The Plant Cell*, 12, 507-518.
- Reinhardt, D., Pesce, E.-R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. und Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *nature*, 426, 255-260.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M. und Schmülling, T. (2006). *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, 18, 40-54.
- Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S. und Blumwald, E. (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19631-19636.
- Röbbelen, G. (1994). Accessible and exploitable diversity for oilseed breeding. *Progress in Lipid Research*, 33, 137-145.
- Rojo, E., Sharma, V.K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V. und Fletcher, J.C. (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *The Plant Cell*, 14, 969-977.
- Romanov, G.A., Lomin, S.N. und Schmülling, T. (2006). Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany*, 57, 4051-4058.
- Running, M.P., Fletcher, J.C. und Meyerowitz, E.M. (1998). The *WIGGUM* gene is required for proper regulation of floral meristem size in *Arabidopsis*. *Development*, 125, 2545-2553.
- Running, M.P., Lavy, M., Sternberg, H., Galichet, A., Gruissem, W., Hake, S., Ori, N. und Yalovsky, S. (2004). Enlarged meristems and delayed growth in *plp* mutants result from lack of CaaX prenyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 7815-7820.
- Rupp, H.M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M. und 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, 557-563.
- Sakai, H., Aoyama, T. und Oka, A. (2000). *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *The Plant Journal*, 24, 703-711.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. und Oka, A. (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 294, 1519-1521.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 431-449.
- Sambrook, J. und Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Samuelson, M.E., Eliasson, L. und Larsson, C.M. (1992). Nitrate-regulated growth and cytokinin responses in seminal roots of barley. *Plant Physiology*, 98, 309-315.

- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulsen, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating-inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5467.
- Sanmartín, M., Sauer, M., Muñoz, A., Zouhar, J., Ordóñez, A., van de Ven, Wilhelmina T.G., Caro, E., de la Paz Sánchez, M., Raikhel, Natasha V., Gutiérrez, C., Sánchez-Serrano, José J. und Rojo, E. (2011). A molecular switch for initiating cell differentiation in Arabidopsis. *Current Biology*, 21, 999-1008.
- Sawa, S., Ito, T., Shimura, Y. und Okada, K. (1999a). *FILAMENTOUS FLOWER* controls the formation and development of Arabidopsis inflorescences and floral meristems. *The Plant Cell*, 11, 69-86.
- Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Kanaya, E., Morita, E.H. und Okada, K. (1999b). *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of Arabidopsis, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes and Development*, 13, 1079-1088.
- Scheres, B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *nature reviews molecular cell biology*, 8, 345-354.
- Schmidt, R., Acarkan, A. und Boivin, K. (2001). Comparative structural genomics in the Brassicaceae family. *Plant Physiology and Biochemistry*, 29, 253-262.
- Schnittger, A., Grini, P.E., Folkers, U. und Hülskamp, M. (1996). Epidermal fate map of the Arabidopsis shoot meristem. *Developmental Biology*, 175, 248-255.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, G. und Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 100, 635-644.
- Schuetz, M., Berleth, T. und Mattsson, J. (2008). Multiple MONOPTEROS-dependent pathways are involved in leaf initiation. *Plant Physiology*, 148, 870-880.
- Schwab, R., Ossowski, S., Rießer, M., Warthmann, N. und Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18, 1121-1133.
- Sharma, V.K., Ramirez, J. und Fletcher, J.C. (2003). The Arabidopsis *CLV3-like (CLE)* genes are expressed in diverse tissues and encode secreted proteins. *Plant Molecular Biology*, 51, 415-425.
- Smart, C.M., Scofield, S.R., Bevan, M.W. und Dyer, T.A. (1991). Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *The Plant Cell*, 3, 647-656.
- Smigocki, A.C. (1991). Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene. *Plant Molecular Biology*, 16, 105-115.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. und Meyerowitz, E.M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2, 755-767.
- Spíchal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad, M. und Schmülling, T. (2004). Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology*, 45, 1299-1305.
- Stirnberg, P., Chatfield, S.P. und Leyser, H.M.O. (1999). *AXR1* acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 121, 839-847.
- Stolz, A., Riefler, M., Lomin, S.N., Achazi, K., Romanov, G.A. und Schmülling, T. (2011). The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal*, 67, 157-168.
- Sun, J., Hirose, N., Wang, X., Wen, P., Xue, L., Sakakibara, H. und Zuo, J. (2005). Arabidopsis *SOI33/AtENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in planta. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47, 588-603.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C. und Mizuno, T. (2000). Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 2486-2489.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T. und Tasaka, M. (2001). The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development*, 128, 1127-1135.
- Takano, S., Niihama, M., Smith, H.M.S., Tasaka, M. und Aida, M. (2010). *gorgon*, a novel missense mutation in the *SHOOT MERISTEMLESS* gene, impairs shoot meristem homeostasis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 51, 621-634.

- Takei, K., Sakakibara, H. und Sugiyama, T. (2001a). Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 26405-26410.
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M. und Sugiyama, T. (2001b). Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology*, 42, 85-93.
- Takei, K., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2004). *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 41866-41872.
- Talbert, P.B., Adler, H.T., Parks, D.W. und Comai, L. (1995). The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 121, 2723-2735.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H. und Mori, H. (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, 45, 1028-1036.
- To, J.P., Deruere, J., Maxwell, B.B., Morris, V.F., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E. und Kieber, J.J. (2007). Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *The Plant Cell*, 19, 3901-3914.
- To, J.P.C., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruere, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Kieber, J.J. (2004). Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 16, 658-671.
- Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T. und Sakakibara, H. (2012). *Arabidopsis lonely guy (LOG)* multiple mutants reveal a central role of the *LOG*-dependent pathway in cytokinin activation. *The Plant Journal*, 69, 355-365.
- Town, C.D., Cheung, F., Maiti, R., Crabtree, J., Haas, B.J., Wortman, J.R., Hine, E.E., Althoff, R., Arbogast, T.S., Tallon, L.J., Vigouroux, M., Trick, M. und Bancroft, I. (2006). Comparative genomics of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana* reveal gene loss, fragmentation and dispersa after polyploidy. *The Plant Cell*, 18, 1348-1359.
- U, N. (1935). Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 7, 389-452.
- Uchida, N., Townsley, B., Chung, K.-H. und Sinha, N. (2007). Regulation of SHOOT MERISTEMLESS genes via an upstream-conserved noncoding sequence coordinates leaf development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 15953-15958.
- van Overbeek, J., Conclin, M.E. und Blakeslee, A.F. (1941). Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, 94, 350-351.
- Vanstraelen, M. und Benkova, E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 463-487.
- Vernoux, T., Besnard, F. und Traas, J. (2010). Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology*, 2, 1-14.
- Vidaurre, D.P., Ploense, S., Krogan, N.T. und Berleth, T. (2007). *AMP1* and *MP* antagonistically regulate embryo and meristem development in *Arabidopsis*. *Development*, 134, 2561-2567.
- Vreman, H.J. und Skoog, F. (1972). Cytokinins in *Pisum* transfer ribonucleic acid. *Plant Physiology*, 49, 848-851.
- Wagenitz, G. (2003). Wörterbuch der Botanik: die Termini in ihrem historischen Zusammenhang. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Wang, X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., Bai, Y., Mun, J.-H., Bancroft, I., Cheng, F., Huang, S., Li, X., Hua, W., Wang, J., Wang, X., Freeling, M., Pires, J.C., Paterson, A.H., Chalhoub, B., Wang, B., Hayward, A., Sharpe, A.G., Park, B.-S., Weisshaar, B., Liu, B., Li, B., Liu, B., Tong, C., Song, C., Duran, C., Peng, C., Geng, C., Koh, C., Lin, C., Edwards, D., Mu, D., Shen, D., Soumpourou, E., Li, F., Fraser, F., Conant, G., Lassalle, G., King, G.J., Bonnema, G., Tang, H., Wang, H., Belcram, H., Zhou, H., Hiraoka, H., Abe, H., Guo, H., Wang, H., Jin, H., Parkin, I.A.P., Batley, J., Kim, J.-S., Just, J., Li, J., Xu, J., Deng, J., Kim, J.A., Li, J., Yu, J., Meng, J., Wang, J., Min, J., Poulain, J., Hatakeyama, K., Wu, K., Wang, L., Fang, L., Trick, M., Links, M.G., Zhao, M., Jin, M., Ramchiary, N., Drou, N., Berkman, P.J., Cai, Q., Huang, Q., Li, R., Tabata, S., Cheng, S., Zhang, S., Zhang, S., Huang, S., Sato, S.,



- Sun, S., Kwon, S.-J., Choi, S.-R., Lee, T.-H., Fan, W., Zhao, X., Tan, X., Xu, X., Wang, Y., Qiu, Y., Yin, Y., Li, Y., Du, Y., Liao, Y., Lim, Y., Narusaka, Y., Wang, Y., Wang, Z., Li, Z., Wang, Z., Xiong, Z. und Zhang, Z. (2011). The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*, 43, 1035-1039.
- Weigel, D. und Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. und Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 10487-10492.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., van Onckelen, H. und Schmülling, T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, 15, 2532-2550.
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. und Schmülling, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, 8, 371-381.
- Williams, L., Grigg, S.P., Xie, M., Christensen, S. und Fletcher, J.C. (2005). Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA *miR166g* and its *AtHD-ZIP* target genes. *Development*, 132, 3657-3668.
- Williams, R.W. (1998). Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif. *BioEssays*, 20, 280-282.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. und Provart, N.J. (2007). An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, e718.
- Wulfetange, K., Lomin, S.N., Romanov, G.A., Stolz, A., Heyl, A. und Schmülling, T. (2011). The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, 156, 1808-1818.
- Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K. und Oliver, D. (1999). A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 40, 711-717.
- Xie, M., Tataw, M. und Venugopala Reddy, G. (2009). Towards a functional understanding of cell growth dynamics in shoot meristem stem-cell niche. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20, 1126-1133.
- Yadav, R.K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M. und Reddy, G.V. (2009). Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 4941-4946.
- Yadav, R.K., Tavakkoli, M. und Reddy, G.V. (2010). WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. *Development*, 137, 3581-3589.
- Yadav, R.K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jönsson, H. und Reddy, G.V. (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes and Development*, 25, 2025-2030.
- Yalovsky, S., Kulukian, A., Rodríguez-Concepción, M., Young, C.A. und Grissem, W. (2000). Functional requirement of plant farnesyltransferase during development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12, 1267-1278.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A. und Ori, N. (2005). *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology*, 15, 1566-1571.
- Yoshida, S., Mandel, T. und Kuhlemeier, C. (2011). Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes and Development*, 25, 1439-1450.
- Zhao, C., Craig, J.C., Petzold, H.E., Dickerman, A.W. und Beers, E.P. (2005). The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the *Arabidopsis* root-hypocotyl. *Plant Physiology*, 138, 803-818.
- Zhao, Z., Andersen, S.U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J. und Lohmann, J.U. (2010). Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *nature*, 465, 1089-1092.
- Zhong, R., Taylor, J.J. und Ye, Z.H. (1997). Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell*, 9, 2159-2170.
- Zhong, R. und Ye, Z.-H. (1999). *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *The Plant Cell*, 11, 2139-2152.

- Zhong, R. und Ye, Z.H. (2004). *Amphivasal vascular bundle 1*, a gain-of-function mutation of the *IFL1/REV* gene, is associated with alterations in the polarity of leaves, stems and carpels. *Plant and Cell Physiology*, 45, 369-385.
- Zhou, G.-K., Kubo, M., Zhong, R., Demura, T. und Ye, Z.-H. (2007). Overexpression of miR165 affects apical meristem formation, organ polarity establishment and vascular development in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 48, 391-404.
- Zürcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkeli, K., Tarr, P.T. und Müller, B. (2013). A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta. *Plant Physiology*.

## 8. Verzeichnis der erfolgten Publikationen

Bartrina I., Otto E., Strnad M., Werner T. & Schmülling T. (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23, 69-80.

## 9. Anhang

**Tabelle 20** Liste der in der Arbeit verwendeten Primer

Name	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
Teilprojekt AHP6		
AHP6-F	GAAGCAAGACCTGTTACATTAG	In-situ-Hybridisierung
AHP6-R	GGGTTTCGCTTCGGTAGC	
AHP6-F-T7	TAATACGACTCACTATAGAAGCAAGACCT GTTACATTAG	
AHP6-R-T7	TAATACGACTCACTATAGGGTTTCGCTTCG GTAGC	
AHP6-F-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TGGAAGCAAGACCTGTTACATTAG	Klonierung pDONR221/AHP6
AHP6-R-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AGGGTTTCGCTTCGGTAGC	
CKX3-A3	CTCGGCTAAAGACGGAGTTG	Nachweis von T-DNA Insertionen
CKX3-A2	TCAAAAGCCTCCCAATTGTC	
CKX5B	AATGGTATATTGTGATGACAGGTGAGATG	
CKX5-2Wis	TTGTTGCAGCAACGACCAACCGATAATGA	
ahp6-3-F	GAGCAGTTCTTGCAGCTTCAGCAG	
ahp6-3-R	AGGGTTTCGCTTCGGTAGC	
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	
ahp6-1-F	GACGAGCAGTTCTTGCAGCTTCTG	Nachweis der <i>ahp6-1</i> Mutation
ahp6-1-R	CGTCACGAACCCTACGAGCACC	

Name	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
<b>Teilprojekt Meristemdomänen</b>		
pCLV1-F-5651up	GTCGACTTTTACGTGTGCATG	Klonierung pDONR P4-P1r/pCLV1
pCLV1-R-3up mod	CCTTTAGTGTCTCTCAGTG	
pCLV1-F-attB4	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCCG TCGACTTTTACGTGTGCATG	
pCLV1-R-attB1r	GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGCCCT TTAGTGTCTCTCAGTG	
pCLV1-iF-4669	CTTAGGGAAGGCTGCTTCTC	Sequenzierung pDONR-P4-P1r/pCLV1
pCLV1-iF-3702	CTGCCTATCTTCATAAACTC	
pCLV1-iF-2972	CATGATTGACAAGACTATGACC	
pCLV1-iF-2124	GGTTGCACTTGTACCTGTTG	
pCLV1-iF-1186	CTTGAAGCAGAAGGTCTG	
pCLV1-iF-580up	CTCTAAAGTTTGACTCCAG	
pCLV1-iR-4594up	CCCACTTCTTATAGGCAATG	
pCLV3-F	CGGACGGATTATCCATAAT	Klonierung pDONR P4-P1r/pCLV3
pCLV3-R	CCGAGAGAAATATAGAAACTG	
pCLV3-F-attB4	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCCG GACGGATTATCCATAAT	
pCLV3-R-attB1r	GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGCCCG AGAGAAATATAGAAACTG	
tCLV3-F-Ler	TTGAGCTCCCTTGACCTAATCTCTTGTTGC	Klonierung pDONR P2r-P3/tCLV3
tCLV3-R-Tomas	CGACGTTTTCTTAATATGTGTG	
tCLV3-F-attB2r	GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCTT GAGCTCCCTTGACCTAATCTCTTGTTGC	
tCLV3-R-Tom-attB3	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCCG ACGTTTTCTTAATATGTGTG	
pWUS-F	CGCCAATATAATCGACTAAAG	Klonierung pDONR P4-P1r/pWUS
pWUS-R	CGTGTGTTTGATTGACT	
pWUS-F-attB4	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCC GCCAATATAATCGACTAAAG	
pWUS-R-attB1r	GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGCCGT GTGTTTGATTGACT	
pCLV3-F-halb-attB1	CAAAAAAGCAGGCTTGCGGACGGATTATC CATAAT	Klonierung pDONR221/pCLV3
pCLV3-R-halb-attB2	CAAGAAAGCTGGGTACCGAGAGAAATATA GAAACTG	

Anhang

attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TG	
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT A	
tCLV3-F-Ler-NcoI	CTGACCATGGTTGAGCTCCCTTGACCTAAT C	Klonierung pKGWFS7/pCLV3/tCLV3
tCLV3-R-Tom-AatII	GGATGACGTCCGACGTTTTCTTAATATGTG TG	
tCLV3-iF	GAGGAGTATCAAAACGAC	Sequenzierung pKGWFS7/pCLV3/tCLV3
tCLV3-iR	CGTAAGCGTTATTTGAGGTG	
CKX1-iF-qRT	GCGCAGCAGCAAACCTCAAC	Semiquantitative RT-PCR
ARR1-iF-qRT	AACCACCAGCAGCCACCATC	
attB2-qRT_rev	GCCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG	
Aktin2-F	TACAACGAGCTTCGTGTTGC	
Aktin2-R	GATTGATCCTCCGATCCAGA	
ROCK2-qRT2_for	CCCGATATTAGCAATGACAGCAGATG	qRT-PCR (in Kombination mit attB2-qRT_rev)
At3g25800-F	CCATTAGATCTTGTCTCTCTGCT	
At3g25800-R	GACAAAACCCGTACCGAG	
UBC10-F	CCATGGGCTAAATGGAAA	
UBC10-R	TTCATTTGGTCCTGTCTTCAG	
Flor2	CTCACTCAAGCTCATGCTCACG	Nachweis <i>clv3-2</i> -Allel
Flor3	GGGAGCTGAAAGTTGTTTCTTGG	
c32x	TATGCGAGGATTATAAATGCC	
stm-1-CAPS1	TTTATTAGATTAATGATAACATTTAAGTC GATATGAACAATGAATTTGTAGATGCA	Nachweis <i>stm-1</i> -Allel
stm-1-CAPS2	GTATAAGGGAAGAGATTACCGAAG	
bum1-F	AGAAGCTCGTCAACAACACTGCTTGATCG	Nachweis <i>bum1</i> -Allel
bum1-R	ATGCCAACATGAGCTAACATAAAC	
gor-F	ATGTAGCTGTGATCATGGACTGAC	Nachweis <i>gor</i> -Allel
gor-R	TATGTTCCAAGTATACCGAGAACC	
wus4-CAPS-F	AGTCGAATCAAACACACATG	Nachweis <i>wus-4</i> -Allel
wus4-CAPS-RsaI	GTAGTAAAGTTCTTTGAGGATTTTGATGT	

Name	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
<b>Teilprojekt Brassica</b>		
F-CKX3-BnEST	ATGGCAAGTAATAATTTTCCATCCC	Klonierung pDONR221/BolCKX3-C2- cDNA, pDONR221/BraCKX3- A2-cDNA
R-BrCKX3+2	GCCTAACACAAGTTTATTTATTG	
F-BnCKX3-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TGATGGCAAGTAATAATTTTCCATCCC	
R-BnCKX3+2- attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AGCCTAACACAAGTTTATTTATTG	
F-CKX5-BrBAC	ATGACTCCTGAAATGACGTC	Klonierung pDONR221/BolCKX5-C1- cDNA, pDONR221/BraCKX5- A1-Gen, pDONR221/BraCKX5-A1- cDNA
R-CKX5-BrBAC	TCACCATGAAGCTGACGACG	
F-CKX5-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TGATGACTCCTGAAATGACGTC	
R-CKX5-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ATCACCATGAAGCTGACGACG	
BnCLV1-R	TTAGGAGGGTTAGTGAGCATG	Klonierung pDONR221/BolCLV1-989bp- Teil, pDONR221/BraCLV1- 989bp-Teil
BnCLV1-iF-2020	CACGAGAGATCCCTCTCCTG	
iF-CLV1-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TGCACGAGAGATCCCTCTCCTG	
R-CLV1-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ATTAGGAGGGTTAGTGAGCATG	
Br/Bo CKX3- iR297-T7	TAATACGACTCACTATAGGCTATAGGGAA AGAGGATTG	In-situ-Hybridisierung (in Kombination mit F-CKX3- BnEST, F-CKX5-BrBAC bzw. BnCLV1-iF-2020)
Br/Bo CKX5- iR278-T7	TAATACGACTCACTATAGCTGAGACCGGA AAGGCC	
BnCLV1-R-T7	TAATACGACTCACTATAGTTAGGAGGGTT AGTGAGCATG	
antiCKX3-1.I	GATTTTCGAGTTTAATACTGGCTCTCTCTCT TTTGTATTCC	Herstellung amiRNA 3.1
antiCKX3-1.II	GAGAGCCAGTATTAAGCTCGAAATCAAAG AGAATCAATGA	
antiCKX3-1.III	GAGCGCCAGTATTATACTCGATATCACAG GTCGTGATATG	
antiCKX3-1.IV	GATATCGAGTATAATACTGGCGCTCTACA TATATATTCCCT	
antiCKX3-2.I	GATTAAATACAAATAGTCCGTCGTCTCTCT TTTGTATTCC	Herstellung amiRNA 3.2
antiCKX3-2.II	GACGACGGACTATTTGTATTTAATCAAAG AGAATCAATGA	
antiCKX3-2.III	GACGCCGGACTATTTCTATTTATTCACAGG TCGTGATATG	

antiCKX3-2.IV	GAATAAATAGAAATAGTCCGGCGTCTACA TATATATTCCT	
antiCKX5-1.I	GATATTTTCTGACCGGTAGCGAGTCTCTCT TTTGTATTCC	Herstellung amiRNA 5.1
antiCKX5-1.II	GACTCGCTACCGGTCAGAAAATATCAAAG AGAATCAATGA	
antiCKX5-1.III	GACTAGCTACCGGTCTGAAAATTTACAG GTCGTGATATG	
antiCKX5-1.IV	GAAATTTTCAGACCGGTAGCTAGTCTACA TATATATTCCT	
antiCKX5-2.I	GATTTATTCCCTAAAATGCCCTGTCTCTCT TTTGTATTCC	Herstellung amiRNA 5.2
antiCKX5-2.II	GACAGGGCATTTTAGGGAATAAATCAAAG AGAATCAATGA	
antiCKX5-2.III	GACAAGGCATTTTAGCGAATAATTCACAG GTCGTGATATG	
antiCKX5-2.IV	GAATTATTCGCTAAAATGCCTTGTCTACAT ATATATTCCT	
OligoA	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	Herstellung und Klonierung verschiedener amiRNA- Konstrukte
OligoB	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG	
OligoA-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT TGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	
Oligo-BattB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG	
attB2r-OligoA	GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCC TGCaAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	
attB3-OligoB	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCGC GGATAACAATTTACACAGG	
F-35S	CTATGACCATGATTACGCC	Klonierung pDONR P4-P1r/p35S
R-35S	CCGTGTTCTCTCCAAATG	
attB4-F-35S	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCC TATGACCATGATTACGCC	
attB1r-R35S	GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGCCCG TGTTCTCTCCAAATG	
qRT-BraCKX3-F	ACTCAGATCTTTTCTACGCGGCG	qRT-PCR
qRT-BraCKX3-R	CCGTCCGCTTCTGATATCAATCGT	
qRT-BraCKX5-F	TCCACACCCATGGCTCAACC	
qRT-BraCKX5-R	ACGGCCGAGCTTCTTTTCGTC	
BrTIP41-F	AGAGTCATGCCAAGTTCATGGTT	
BrTIP41-R	CCTCATAAGCACACCATCAACTCTAA	



**Tabelle 21** Primerkombinationen mit entsprechenden PCR-Produktlängen und ggf. verwendeten Restriktionsenzymen

<b>Ziel</b>	<b>Primer</b>	<b>Länge PCR-Produkt, ggf. Verdau</b>
<i>CKX3</i> Wildtypallel (Bartrina <i>et al.</i> 2011)	CKX3-A2, CKX3-A3	2,7 kb
<i>ckx3-1</i> T-DNA Nachweis (Bartrina <i>et al.</i> 2011)	CKX3-A2, LBa1	0,6 kb
<i>CKX5</i> Wildtypallel (Bartrina <i>et al.</i> 2011)	CKX5B, CKX5-2Wis	2,2 kb
<i>ckx5-1</i> T-DNA Nachweis (Bartrina <i>et al.</i> 2011)	CKX5-2Wis, LBa1	1,8 kb
<i>AHP6</i> Wildtypallel (Mähönen, persönl. Mitteilung)	AHP6-3-F, AHP6-3-R	0,8 kb
<i>ahp6-3</i> T-DNA Nachweis (Mähönen, persönl. Mitteilung)	LBb1, AHP6-3-R	0,7 kb
Nachweis <i>ahp6-1</i> Allel (Mähönen, persönl. Mitteilung)	ahp6-1-F, ahp6-1-R	332 bp, Verdau Wildtypallel mit <i>Pst</i> I
<i>CLV3</i> Wildtypallel	Flor2, Flor3	360 bp
Nachweis <i>clv3-2</i> -Allel (Müller 2007)	Flor2, c32x	390 bp
Nachweis <i>stm-1C</i> -Allel (Uchida <i>et al.</i> 2007)	stm-1-CAPS1, stm-1-CAPS2	248 bp, Verdau <i>stm-1C</i> -Allel mit <i>Nsi</i> I
Nachweis <i>bum1</i> -Allel (Jasinski <i>et al.</i> 2005)	bum1-F, bum1-R	235 bp, Verdau <i>bum1</i> -Allel mit <i>Cla</i> I
Nachweis <i>gor</i> -Allel (Takano <i>et al.</i> 2010)	gor-F, gor-R	387 bp, Verdau <i>gor</i> -Allel mit <i>Mbo</i> II
Nachweis <i>wus-4</i> -Allel	wus4-CAPS-F, wus4-CAPS-R	179 bp, Verdau <i>wus-4</i> -Allel mit <i>Rsa</i> I

**Tabelle 22** Charakterisierung der Raps (Mozart) Primärtansformanten mit amiRNA-Transgen. Nicht-transgene Kontrollpflanzen, die ebenfalls aus Hypokotylen regeneriert wurden, sind mit einem „K“ gekennzeichnet. Besonders interessante Pflanzen sind grau unterlegt. Die Daten stammen von der NPZ Lembke KG.

T1-Pflanze	T2-Saatgut [g]	Schoten	TKG [g]
8106.3	2,95	81	4,40
8106.4	4,45	117	4,23
8106.5	9,70	287	2,70
8106.6	3,27	96	3,63
8106.8	0,46	78	3,40
8106.10	0,54	51	4,40
8106.14	6,60	186	3,13
8106.18	6,37	233	2,23
8106.20	5,67	169	2,86
8106.21	1,60	91	1,76
8106.22	4,65	153	2,66
8106.24	6,47	171	2,96
8106.26	4,19	178	2,40
8106.27	7,17	227	3,63
8106.28	1,71	107	1,93
8106.29	11,65	229	3,73
8106.30	5,17	145	2,20
8106.31	6,14	153	2,70
8106.33	3,94	183	1,93
8106.34	4,52	193	4,60
8106.36	2,71	170	2,93
8106.37	5,31	299	3,80
8106.39	5,69	208	2,03
8106.40	3,02	167	3,76
8106.41	3,09	166	4,43
8106.46	2,26	109	3,00
8106.49	8,52	244	2,23
8106.101K	4,18	200	2,03
8106.102K	8,31	215	2,66
8107.1	6,23	140	4,63
8107.2	3,59	84	3,26
8107.4	8,64	215	3,06
8107.5	4,57	122	2,76
8107.6	5,93	151	3,13
8107.7	4,80	137	2,63
8107.8	3,78	112	3,80
8107.10	4,42	93	3,00
8107.11	2,03	81	3,70
8107.14	2 Körner	3	-
8107.16	2,92	95	2,66
8107.18	4,35	182	3,50
8107.20	1,20	164	2,60
8107.24	3,18	81	3,13
8107.25	3,57	123	2,16
8107.28	19 Körner	24	-
8107.32	3,26	95	2,73
8107.33	6,60	141	2,53

Anhang

---

8107.34	4,40	128	3,00
8107.39	5,46	136	3,10
8107.40	2,20	135	3,13
8107.41	3,98	120	3,16
8107.42	3,46	112	2,90
8107.47	1,57	178	4,26
8107.48	3,32	125	2,76
8107.52	5,44	148	2,83
8107.55a	4,62	124	4,33
8107.101K	5,36	111	3,26
8107.102K	4,53	92	2,80
8107.103K	2,43	101	2,76
8107.104K	5,00	112	2,83
<hr/>			
8108.58	3,18	133	3,13
8108.59	6,43	180	2,86
8108.60	7,80	314	1,90
8108.61	8,77	202	3,06
8108.62	0,87	158	4,20
8108.63	4,20	152	2,13
8108.64	5,17	171	2,66
8108.101K	2,76	147	2,86
8108.102K	2,33	111	2,23
<hr/>			
8109.1	3,5	130	3,53
8109.2	3,93	131	2,63
8109.4	3,34	144	2,20
8109.6	2,21	80	3,33
8109.11	5,88	125	3,16
8109.12	0,50	57	3,2
8109.14	3,96	118	2,56
8109.20	5,90	125	2,83
8109.40	0,16	112	2,6
8109.41	3,57	118	4,13
8109.42	10,62	260	3,00
8109.49	3,26	75	3,50
8109.52	4,76	147	4,30
8109.56	5,90	135	2,93
8109.59	1,26	109	3,10
8109.65	1,41	86	2,80
8109.66	6,17	192	2,30
8109.67	7,19	195	2,66
8109.69	10,72	241	3,00
8109.71	1,38	111	3,43
8109.73	8,08	189	2,90
8109.77	9,05	242	2,33
8109.78	4,16	111	2,60
8109.79	1,37	218	3,76
8109.80	2,49	165	2,16
8109.81	0,69	88	2,80
8109.82	9,31	255	2,16
8109.83	5,76	156	2,56
8109.84	7,38	192	2,53
8109.85	4,58	242	2,33
8109.86	4,86	164	2,43
8109.87	1,69	112	2,40

## Anhang

---

8109.89	5,34	143	2,63
8109.90	4,22	118	3,16
8109.91	6,48	171	2,63
8109.92	7,89	206	2,36
8109.93	4,55	168	3,20
8109.94	7,82	174	2,56
8109.96	5,82	190	2,56
8109.98	5,44	208	3,76
8109.99	6,12	180	4,96
8109.100	3,38	180	2,63
8109.101	5,48	142	2,63
8109.102	4,84	162	2,66
8109.106	2,59	119	3,26
8109.107	3,90	110	2,60
8109.108	2,5	189	4,46
8109.109	1,47	101	2,20
8109.110	4,52	183	3,80
8109.111	2,33	206	3,43
8109.112	12,07	275	2,63
8109.101K	7,38	170	3,43
8109.102K	5,61	117	3,06
8109.103K	5,06	195	2,76
8109.104K	4,14	180	2,83
8109.105K	2,52	140	2,90
8109.106K	8,12	235	2,63
8109.107K	11,23	242	2,86
8109.108K	2,04	160	2,63