

Die Rolle von Jasmonaten im Prozess der Adventivwurzelentwicklung im Modellsystem *Petunia*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Sandra Lischewski

geboren am 28.08.1974 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter/in

1. PD Dr. B. Hause
2. Prof. Dr. A. Schaller
3. Prof. Dr. K. Humbeck

Halle (Saale), 13. Januar 2012

1	Einleitung	1
1.1	Das Modellsystem <i>Petunia hybrida</i>	1
1.2	Die Regeneration von Adventivwurzeln bei der vegetativen Vermehrung	2
1.2.1	Die histologischen und physiologischen Änderungen	3
1.2.2	Der Einfluss von Phytohormonen	4
1.2.2.1	Auxin	5
1.2.2.2	Ethylen	6
1.2.2.3	Die interaktive Wirkung von Auxin und Ethylen	7
1.2.2.4	Cytokinin und dessen Interaktion mit Auxin	8
1.2.2.5	Gibberellin und Abscisinsäure (ABA)	9
1.3	Die Jasmonate	10
1.3.1	Die Biosynthese der Jasmonate und deren Regulation	10
1.3.1.1	Der Lipoxygenase (LOX)-Biosynthese-Weg	10
1.3.1.2	Der Allenoxid-Synthase (AOS)-Weg: Die Jasmonat-Biosynthese	11
1.3.1.3	Die Metabolisierung der JA	12
1.3.1.4	Die Regulation der Jasmonat-Biosynthese	13
1.3.2	Der Mechanismus der Jasmonat-Erkennung in der Pflanze	14
1.3.3	Die Reaktion der Pflanze auf Verwundung und die Rolle der Jasmonate in diesem Prozess	15
1.3.3.1	Die Reaktionen im verwundeten Gewebe	16
1.3.3.2	Die systemischen Reaktionen	17
1.4	Die Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Pflanzen	19
2.1.2	Bakterienstämme	19
2.1.3	Vektoren	20
2.1.4	Chemikalien und Enzyme	20
2.1.5	Oligonukleotide	20
2.2	Die Anzucht und Transformation von Bakterien	21
2.2.1	Die Anzucht von Bakterien	21
2.2.2	Die Herstellung und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	21
2.2.3	Die Herstellung und Transformation kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen	21
2.3	Die Anzucht, Kultivierung und Transformation von Pflanzen	21
2.3.1	Die Anzucht und Kultivierung von Pflanzenmaterial	21
2.3.2	Die Ernte und Bewurzelung von Stecklingen	22
2.3.3	Die Transformation von <i>Petunia hybrida</i>	22
2.4	Pharmakologische Experimente	23

2.5	Molekularbiologische Methoden	24
2.5.1	Die Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	24
2.5.1.1	Die Isolierung von DNA	24
2.5.1.2	Die Isolierung von RNA	24
2.5.1.3	Die Reinigung von DNA	24
2.5.1.4	Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
2.5.2	Die Modifizierung und Analyse von Nukleinsäuren	25
2.5.2.1	Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.5.2.2	Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	25
2.5.2.3	Die Ligation	25
2.5.2.4	Die enzymatische Spaltung von DNA	25
2.5.2.5	Das Auffüllen von 5`Überhängen	26
2.5.2.6	Die Markierung von DNA-Fragmenten	26
2.5.2.7	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.5.2.8	Die quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)	27
2.5.2.9	Der spezifische Nachweis von Nukleinsäuren (Southern Blot-Analyse)	28
2.5.2.10	Die Sequenzierung von DNA und die Sequenzanalyse	30
2.6	Das <i>Screening</i> einer Population von <i>dTph1</i>-Insertionsmutanten	30
2.7	Die Generierung transgener <i>AOC-sense</i>- bzw. <i>AOC-RNAi</i>-Pflanzen	30
2.8	Die Isolierung und Klonierung der <i>PhAOC</i> sowie deren heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	32
2.8.1	Die Isolierung und Klonierung	32
2.8.2	Die heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	32
2.9	Biochemische Methoden und Analytik	33
2.9.1	Die Gewinnung von Proteinrohextrakten aus Pflanzenmaterial	33
2.9.2	Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	33
2.9.3	Das Fällern und Konzentrieren von Proteinlösungen	33
2.9.4	Die Reinigung von His-Fusionsproteinen	33
2.9.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	34
2.9.6	Der spezifische Nachweis von Proteinen (Western Blot-Analyse)	34
2.9.7	Der gekoppelte Enzym-Aktivitätstest	35
2.9.8	Die Gehaltsbestimmung von OPDA, JA, 12-OH-JA und JA-Ile	36
2.9.9	Die Gehaltsbestimmung von IAA und ACC	36
2.10	Zellbiologische Methoden	37
2.10.1	Die Einbettung von Pflanzenmaterial in Polyethylenglycol (PEG)	37
2.10.2	Die Immunmarkierung von Dünnschnitten	37
2.10.3	Die Bestimmung der Primordienanzahl in der Stecklingsbasis	38
2.11	Statistische Methoden	39

3	Ergebnisse	40
3.1	Die Jasmonat-Biosynthese während der Bewurzelung von <i>Petunia</i>-Stecklingen	40
3.1.1	Die Isolierung und Charakterisierung der <i>PhAOC</i>	40
3.1.1.1	Die Isolierung der <i>PhAOC</i> cDNA	40
3.1.1.2	Die funktionelle Charakterisierung der <i>PhAOC</i>	42
3.1.2	Die Jasmonat-Biosynthese während der Stecklingsbewurzelung	45
3.1.2.1	Die Jasmonat-Gehalte während der Stecklingsbewurzelung	46
3.1.2.2	Die Akkumulation des <i>PhAOC</i> -Transkripts und die enzymatische Aktivität der <i>PhAOC</i> während der Stecklingsbewurzelung	47
3.1.2.3	Die Lokalisierung der <i>AOC</i> in <i>Petunia</i> -Stecklingen	48
3.2	Die Akkumulation von Auxin- bzw. Ethylen während der Bewurzelung von <i>Petunia</i>-Stecklingen	50
3.3	Der Einfluss von Jasmonaten auf die Bewurzelung von <i>Petunia</i>-Stecklingen	53
3.3.1	Die Wirkung exogen verabreichter Jasmonate auf den Bewurzelungsprozess	54
3.3.2	Der Einfluss einer modulierten Jasmonat-Biosynthese auf den Bewurzelungsprozess	63
3.3.2.1	Die Analyse einer Population von <i>dTph1</i> -Insertionsmutanten	64
3.3.2.2	Die Generierung transgener <i>AOC-sense</i> sowie <i>PhAOC-RNAi</i> Pflanzen	66
3.3.2.3	Die Selektion der Primärtransformanten (Generation T0)	67
3.3.2.4	Die Charakterisierung der <i>AOC-sense</i> -Pflanzen (Generation T1)	70
3.3.2.5	Die Charakterisierung der <i>PhAOC-RNAi</i> -Pflanzen (Generation T1)	72
3.3.2.6	Der Einfluss niedriger Jasmonat-Gehalte auf den Bewurzelungsprozess	73
4	Diskussion	80
5	Zusammenfassung	99
6	Anhang	101
6.1	Oligonukleotide	101
6.2	Nukleotid- bzw. Aminosäure-Sequenzen	104
6.3	Zusätzliche Tabellen und Abbildungen	106
7	Literaturverzeichnis	110

Abkürzungsverzeichnis

11(S)-HPHT	11(S)-Hydroperoxy-7(Z),9(E),13(Z)-hexadecatriensäure
11-OH-JA	11-Hydroxyjasmonsäure
12,13-EOT	12,13-Epoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure
12-HSO ₄ -JA	12-Hydroxysulfonyloxyjasmonsäure
12-OH-JA	12-Hydroxyjasmonsäure
13(S)-HPOD	13(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadiensäure
13(S)-HPOT	13(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure
13(S)-HPOTE	13(S)-Hydroperoxy-6(Z),9(Z),11(E),15(Z)-octadecatetraensäure
15(S)-HPEP	15(S)-Hydroperoxy-5(Z),8(E),11(Z),13(E),17(Z)-eicosapentaensäure
15(S)-HPETE	15(S)-Hydroperoxy-5(Z),8(E),11(Z),13(E),17(Z)-eicosapentaensäure
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
9(S)-HPOD	9(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadiensäure
9(S)-HPOT	9(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure
ABA	Abscisinsäure
ABC	engl. <i>ATP-binding cassette</i>
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
ACO	ACC-Oxidase
ACS	ACC-Synthase
ACT	engl. <i>Activator</i>
ACX	Acyl-CoA-Oxidase
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ^r	Ampicillinresistenz
ANOVA	engl. <i>Analysis of variance</i>
AOC	Allenoxid-Cyclase
AOS	Allenoxid-Synthase
AS	Aminosäure
ASA	engl. <i>ANTHRANILATE SYNTHASE α</i>
ASB	engl. <i>ANTHRANILATE SYNTHASE β</i>
Asn	Asparagin
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
Aux/IAA	engl. <i>Auxin/Indole-3-Acetic Acid</i>
AVG	Aminoethoxyvinylglycin
BAC	engl. <i>Bacterial artificial chromosome</i>
BAP	Benzylaminopurin

BLAST	engl. <i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
CaM	Calmodulin
CaMV	engl. <i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	engl. <i>Complementary DNA</i>
CEL	engl. <i>Comparative expression level</i>
CEV	engl. <i>Constitutive expression of VSP</i>
CLSM	engl. <i>Confocal laser scanning microscope</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
COI	engl. <i>CORONATINE INSENSITIVE</i>
CSPD	engl. <i>Chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate</i>
Ct	engl. <i>Cycle threshold</i>
DAD	engl. <i>Decreased apical dominance</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
dest.	destilliert
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ds	engl. <i>Dissociator</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
dTph	engl. <i>Defective transposon Petunia hybrida</i>
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ERF	engl. <i>ETHYLENERESPONSE FACTOR</i>
EST	engl. <i>Expressed sequence tag</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
ETR	engl. <i>ETHYLENE RESPONSE</i>
FG	Frischgewicht
for	engl. <i>Forward</i>
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
Glu	Glutaminsäure

Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	engl. <i>High pressure liquid chromatography</i>
HPT	Hygromycin Phosphotransferase
Hv	<i>Hordeum vulgare</i>
Hyg ^r	Hygromycinresistenz
IAA	Indol-3-essigsäure
IBA	Indol-3-buttersäure
IgG	Immunglobulin G
Ile	Isoleucine
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
JA	Jasmonsäure
JAR	engl. <i>Jasmonate resistant</i>
Jas	engl. <i>Jasmonate-associated</i>
JAZ	engl. <i>Jasmonate ZIM-domain</i>
Kan ^r	Kanamycinresistenz
KAT	L-3-Ketoacyl-CoA-Thiolase
LAP	Leucin-Aminopeptidasen
LB	Luria-Bertani
LIN	engl. <i>Lycopersicon invertase</i>
LOX	Lipoxygenase
LV	leerer Vektor
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MFP	engl. <i>Multifunctional protein</i>
MG	Molekulargewicht
mRNA	engl. <i>Messenger RNA</i>
MS	Murashige und Skoog
Mt	<i>Medicago truncatula</i>
MYC	engl. <i>Myelocytomatosis</i>
n	Stichprobengröße
NAA	1-Naphthylelessigsäure
NOS prom	Promotor der <i>Nopalinsynthase</i> aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
NPA	1-N-Naphthylphtalaminsäure
NPTII	Neomycin Phosphotransferase II
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
OCS term	Terminationssequenz der <i>Octopinsynthase</i> aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
OPC-8	3-oxo-2-(2'(Z)-pentenyl)-cyclopentan-1-oktansäure

OPDA	12-Oxo-10,15(Z)-phytydiensäure
OPR	OPDA-Reduktase
p	Signifikanzwert (p-Wert)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAT	engl. <i>Polar auxin transport</i>
PCIB	p-Chlorophenoxyisobuttersäure
Pcl	engl. <i>Pea cell-wall invertase</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDF	engl. <i>Plant defensin</i>
PED	engl. <i>Peroxisomal defective</i>
PEG	Polyethylenglycol
Ph	<i>Petunia hybrida</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
pHell	pHellsgate 8
PI	Proteinase-Inhibitoren
PIN	engl. <i>PIN-FORMED</i>
pMDC	pMDC 32
PR	engl. <i>Pathogenesis-related</i>
Pro	Prolin
PXA	engl. <i>Peroxisomal ABC transporter</i>
qRT-PCR	quantitative Real-Time RT-PCR
RACE	engl. <i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
RBX	engl. <i>RING-box protein</i>
rev	engl. <i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	engl. <i>RNA-interferenz</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPS13	Ribosomales Protein S13
RT	Reverse Transkription
SAUR	engl. <i>Small auxin-up RNA</i>
SCF	engl. <i>Skp1-cullin-F-box protein complex</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SKP	engl. <i>S-phase kinase-associated protein</i>
Sl	<i>Solanum lycopersicum</i>
Spe ^r	Spectinomycinresistenz
St	<i>Solanum tuberosum</i>
STS	Silberthiosulfat

T(x)	Generation nach Transformation
TAT	engl. <i>Tyrosine aminotransferase</i>
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Transposables Element
TIBA	2,4,5-Trijodbenzoesäure
TIR	engl. <i>Transport inhibitor response</i>
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxylmethyl)-Aminomethan
Trp	Tryptophan
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VSP	engl. <i>Vegetative storage protein</i>
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
ZIM	engl. <i>Zinc-finger protein expressed in inflorescence meristem</i>
Zm	<i>Zea mays</i>

1 Einleitung

1.1 Das Modellsystem *Petunia hybrida*

1803 wurden erstmals zwei der Gattung *Petunia* zugehörige Arten *P. parviflora* und *P. nyctaginiflora* (*P. axillaris*) durch Antoine-Laurent de Jussieu beschrieben, wobei der Name *Petunia* von *petum* [indigener Name für Tabak (*Nicotiana tabacum*)] abgeleitet wurde. Die Bezeichnung ging auf die morphologischen Ähnlichkeiten zwischen *P. nyctaginiflora* und *N. tabacum* zurück, weshalb *Petunia* und *Nicotiana* zunächst der gleichen taxonomischen Gruppe (Tribus bzw. Unterfamilie: *Nicotianeae*) zugeordnet wurden (Stehmann *et al.*, 2009). Später erfolgte auf Grundlage weiterführender molekularbiologischer Untersuchungen die Einteilung von *Petunia* und *Nicotiana* in verschiedene Unterfamilien (Olmstead und Bohs, 2007).

Die Gattung *Petunia* gehört zur Familie der *Solanaceae* und umfasst 14 Arten (Stehmann *et al.*, 2009). Die verschiedenen Arten können niederliegende oder aufrechte, klebrig behaarte Einjährige oder Stauden sein, die eine Wuchshöhe von bis zu einem Meter aufweisen. Die einfachen, ei- bis lanzettförmigen Blätter stehen meist paarweise oder wechselständig. *Petunia* bildet große, meist duftende, trichterförmige Blüten aus, die einzeln stehen und achselständig angeordnet sind. Die Blüten bestehen aus fünf miteinander verwachsenen Kronblättern, sind monosymmetrisch und kommen in verschiedenen Farben, wie zum Beispiel rosa, rot, violett oder weiß, vor. Als Früchte bilden sich konische Kapseln aus, die eine Vielzahl kleiner Samen enthalten (Rijkema *et al.*, 2006; Stehmann *et al.*, 2009). Das natürliche Verbreitungsgebiet von *Petunia* erstreckt sich über die gemäßigten bis subtropischen Gebiete Südamerikas, wobei die meisten Arten in Brasilien, Argentinien, Uruguay, Paraguay und Bolivien beheimatet sind (Ando *et al.*, 2001).

Aufgrund der auffälligen Blütenmorphologie wurde *Petunia* ab 1950 erstmals als Modellpflanze für verschiedene Bereiche der Forschung verwendet. So wurden unter anderem genetische und biochemische Analysen in Bezug auf die Blütenentwicklung und die Variation der Blütenfarbe durchgeführt. Aber erst ab den späten 1980er kam *Petunia* als Modellpflanze eine bedeutendere Rolle zu. Dies lag auch darin begründet, dass das Modellsystem *Petunia* viele Vorteile aufweist, die für die Verwendung in der Forschung von Belang sind (Gerats und Vandenbussche, 2005). Neben den einfachen Wachstumsbedingungen und dem relativ kurzen Lebenszyklus lassen sich die meisten verwendeten Sorten, wie zum Beispiel die doppelt haploide Sorte W115 (Mitchel), gut transformieren (Lutke, 2006). Aber auch eine Vielzahl von Materialien und Techniken macht *Petunia* zu einem brauchbaren System. Abgesehen von der zunehmenden Verfügbarkeit von cDNA- und BAC-Bibliotheken steht ein endogenes transposables-Elemente-System zur Verfügung, welches eine effiziente Nutzung sowohl in der klassischen Genetik (Van den Broeck *et al.*, 1998; De Keukeleire *et al.*, 2001) als auch in Ansätzen der *Reverse Genetics* (Koes *et al.*, 1995; Vandenbussche *et al.*, 2003) zulässt. Eine Auswahl an Forschungsbereichen, in denen man die Vorteile des Modellsystems *Petunia* nutzt, sind in Tabelle 1-1 zusammengestellt.

Neben der Relevanz für die Forschung kommt *Petunia* durch die Nutzung als Zierpflanze auch eine große wirtschaftliche Bedeutung zu. Das als Garten-Petunie bekannte Zierpflanzenhybrid *Petunia hybrida* wurde erstmals 1834 durch Züchtung erhalten und ist von den Arten *P. integrifolia* (Hooker) Schinz & Thellung und *P. axillaris* (Lamarck) Britton, Sterns &

Poggemburg abgeleitet (Wijsman, 1982). Die verschiedenen *Petunia hybrida* Sorten besitzen auffällig gefärbte Blüten, die gestreift oder gefleckt sind und eine einfache oder gekräuselte Krone besitzen können. Aufgrund der Vielfalt an Blütenfarben und -formen gehört *Petunia* heute zu einer der beliebtesten Balkon- und Terrassenpflanzen (Niehues, 2009). Als Zierpflanze wird *Petunia hybrida* meist einjährig gezogen und kann sowohl generativ über Samen als auch vegetativ über Stecklinge vermehrt werden.

Tabelle 1-1: Eine Auswahl an Forschungsbereichen, in denen *Petunia* als Modellpflanze Verwendung findet. Die Übersicht wurde nach Gerats und Vandenbussche (2005) verändert.

Forschungsbereiche	Referenzen
Blütenentwicklung	Maes <i>et al.</i> , 2001; Castel <i>et al.</i> , 2010
Mechanismen der Bestäubung	Stuurman <i>et al.</i> , 2004; Hoballah <i>et al.</i> , 2007
Seneszenz	Clark <i>et al.</i> , 2004; Snowden <i>et al.</i> , 2005
Aktivität von meristematischen Gewebe	Stuurman <i>et al.</i> , 2002; Ferrario <i>et al.</i> , 2006
Aktivität von Retroelementen	Galliano <i>et al.</i> , 1995; Richert-Poggeler <i>et al.</i> , 2003
Epigenetik	Meyer, 2000, 2001
Systematik	Wijsman, 1982; dos Reis <i>et al.</i> , 2002
Analyse flüchtiger Stoffe	Verdonk <i>et al.</i> , 2003; Orlova <i>et al.</i> , 2006
Flavonoid-Biosynthese	Beld <i>et al.</i> , 1989; van der Meer <i>et al.</i> , 1992

1.2 Die Regeneration von Adventivwurzeln bei der vegetativen Vermehrung

Die vegetative Vermehrung ist die vom lateinischen *vegetatus* = belebt, lebend, abgeleitete Bezeichnung für die ungeschlechtliche Fortpflanzung von Pflanzen. Im Gegensatz zur generativen geht die vegetative Vermehrung nicht mit einer Neu- und Rekombination der Erbanlagen einher. Dies bedeutet, dass alle phäno- und genotypischen Eigenschaften der Mutterpflanze auf die Tochtergeneration übertragen werden. Sowohl im Obst- und Gartenbau als auch in der Forstwirtschaft werden Pflanzen vegetativ vermehrt, um größere Mengen einheitlich wachsenden und gesunden Pflanzenmaterials zu erzeugen (Davies *et al.*, 1994). Dabei stellt die autovegetative Vermehrung über Stecklinge eine der ältesten und am meisten verwendeten Methoden dar (Fernqvist, 1966; De Klerk *et al.*, 1999). Als Stecklinge werden von der Mutterpflanze abgeschnittene Stücke der Sprossachse, der Wurzel oder des Blattes bezeichnet, aus denen sich neue selbstständige Pflanzen regenerieren. Während dieser Regeneration nimmt die Ausbildung von Adventivwurzeln eine Schlüsselrolle ein, wobei man die Bezeichnung „adventiv“ ausschließlich für Wurzeln verwendete, die nicht aus der embryonalen Entwicklung hervorgegangen sind oder von den Primärwurzeln abzweigen (Lovell und White, 1986).

Die Regeneration von Adventivwurzeln wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. So ist die erfolgreiche Bewurzelung von Stecklingen nicht nur von der zu bewurzelnden Pflanzenspezies abhängig, sondern auch vom Alter der Mutterpflanze, von der Größe und der Art der Stecklinge sowie von der Jahreszeit, in der die Stecklinge geschnitten werden (Fernqvist, 1966; Gaspar und Coumans, 1987). Auch die sich während der Wurzelregeneration ändernden endogenen Gehalte der verschiedenen Phytohormone sowie die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten, Makro- und Mikronährstoffen sind von Bedeutung (Fernqvist, 1966; Jarvis, 1986; Gaspar und Coumans, 1987; Kevers *et al.*, 1997; De Klerk *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2009). Zusätzlich spielen auch exogene Faktoren eine entscheidende Rolle. So beeinflussen zum Beispiel die Lichtverhältnisse, die Wasserzufuhr bzw. Feuchtigkeit, die Temperatur oder das für die Bewurzelung der Stecklinge verwendete Substrat die Regeneration von Adventivwurzeln (Fernqvist, 1966; Gaspar und Coumans, 1987; Li *et al.*, 2009).

1.2.1 Die histologischen und physiologischen Änderungen

Die Regeneration von Adventivwurzeln ist ein komplexer Entwicklungsprozess, der in verschiedene aufeinanderfolgende Phasen unterteilt werden kann (Abbildung 1-1). Dabei variieren in der Literatur sowohl die Anzahl als auch die Terminologie der einzelnen Phasen. Die erste Phase des Regenerationsprozesses wird durch Jarvis (1986), Hausman *et al.* (1997) und Kevers *et al.* (1997) als Induktionsphase beschrieben, kann aber auch als Aktivierungs- (Lovell und White, 1986) oder Dedifferenzierungsphase (Christianson und Warnick, 1983; De Klerk *et al.*, 1997) bezeichnet werden. Während dieser Phase findet noch keine Zellteilung statt. Es sind jedoch erste morphologische Änderungen in einigen Zellen der Wurzelregenerationszone, wie zum Beispiel ein großer, zentral platzierter Zellkern, schmale Vakuolen und dichtes Zytoplasma, nachzuweisen (Mahlstede und Watson, 1952; De Klerk *et al.*, 1995). Die so veränderten Zellen sind für organogene Stimuli empfänglich und sind unabhängig von der Spezies und der Art der Stecklinge meist in der Nähe des Leitgewebes lokalisiert (Mahlstede und Watson, 1952; Lovell und White, 1986; De Klerk *et al.*, 1995).

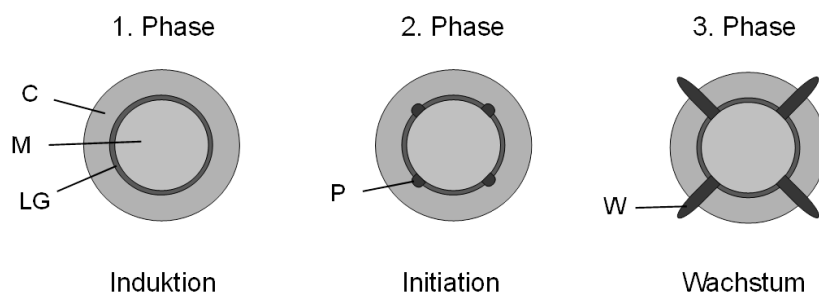


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Regeneration von Adventivwurzeln. Die Einteilung der einzelnen Phasen erfolgte nach Jarvis (1986), Hausman *et al.* (1997) und Kevers *et al.* (1997). **M** Mark, **LG** Leitgewebe, **C** Cortex, **P** Primordium, **W** regenerierte Adventivwurzel.

In der folgenden als Initiation (Jarvis, 1986; Hausman *et al.*, 1997; Kevers *et al.*, 1997) aber auch als Induktion (Christianson und Warnick, 1983; De Klerk *et al.*, 1997) bezeichneten Phase beginnen die Zellen sich zu teilen, nachdem sie durch organogene Stimuli aktiviert wurden. Nach mehreren Zyklen der Zellteilung bilden sich aus ca. 30 Zellen bestehende Konglomerate, die sich durch eine definierte Linie vom umgebenden Gewebe abgrenzen (Mahlstedde und Watson, 1952), jedoch noch keine organisierte Struktur aufweisen. Aus diesen als *root initials* (Cameron und Thomson, 1969) oder als Meristemoide (De Klerk *et al.*, 1995; Naija *et al.*, 2008) bezeichneten Zellkonglomeraten regenerieren sich noch nicht zwangsläufig Wurzeln (Attfeld und Evans, 1991; De Klerk *et al.*, 1995; Lund *et al.*, 1996). Erst ab einer Anzahl von ca. 1500 Zellen und nach dem Ablaufen erster Differenzierungsschritte ist die als Primordium bezeichnete organisierte Masse von meristematischem Gewebe auf die Ausbildung einer Wurzel festgelegt (White und Lovell, 1984).

In der letzten Phase der Regeneration nimmt die Komplexität der Primordien infolge einer weiteren Differenzierung zu und es bildet sich eine Verbindung zwischen Stängel-Leitgewebe und Primordium aus (Lovell und White, 1986). Die nun funktionsfähige Wurzel wächst innerhalb der Rinde bis zur Epidermis, durchbricht diese und wird dann außerhalb des Stecklings sichtbar (Mahlstedde und Watson, 1952). Auch für die letzte Phase der Wurzelregeneration wird kein einheitlicher Terminus gebraucht. Jarvis (1986), Hausman *et al.* (1997) und Kevers *et al.* (1997) nutzen die Bezeichnung Expressions- bzw. Wachstumsphase, aber auch die Begriffe Differenzierungs- (Christianson und Warnick, 1983) oder Realisierungsphase (De Klerk *et al.*, 1997) finden Verwendung.

Die Dauer der einzelnen Phasen kann in Abhängigkeit von der Spezies und der Art des Stecklings stark variieren. So umfasst die erste Phase der Wurzelregeneration in Stecklingen krautiger Pflanzen einen Zeitraum von einige Stunden (Mitsuhashi-Kato *et al.*, 1978) bzw. von ein bis zwei Tagen (Chandra *et al.*, 1971; Blazich und Heuser, 1979). Im Vergleich dazu können in Stecklingen holziger Pflanzen mehrere Tage (Naija *et al.*, 2008) oder Wochen (White und Lovell, 1984) bis zur Aktivierung der Zellen vergehen. Auch sind in manchen Spezies wie zum Beispiel *Populus* oder *Salix* die Primordien schon vorgebildet, sodass die Wurzelregeneration zu einem späteren Zeitpunkt einsetzt und sich so die Zeit bis zum Sichtbarwerden erster Adventivwurzeln verkürzen kann (Lovell und White, 1986).

1.2.2 Der Einfluss von Phytohormonen

Die Regeneration von Adventivwurzeln ist auf ein Zusammenspiel verschiedener Phytohormone bzw. Wachstumsregulatoren zurückzuführen. Dabei wirken die entsprechenden Substanzen entweder direkt und beeinflussen die Zellteilung bzw. das Zellwachstum oder sie wirken indirekt und interagieren mit anderen Wachstumsregulatoren (Li *et al.*, 2009). In der Literatur ist für Auxin, Ethylen, Cytokinin, Gibberellin sowie Abscisinsäure eine Wirkung im Prozess der Wurzelregeneration beschrieben. Für Salizylate, Brassinosteroide und Oxylypine liegen diesbezüglich noch keine oder nur sehr wenige Untersuchungsergebnisse vor.

1.2.2.1 Auxin

Bereits 1935 wurde eine die Wurzelregeneration fördernde Wirkung von Auxin beschrieben (Zimmerman und Wilcoxon, 1935). Sowohl die Applikation von natürlich vorkommenden als auch die von synthetisch hergestellten Auxinen führt zur lokalen Initiation von Adventivwurzeln an Stängeln und Blättern (Gaspar und Coumans, 1987; Kevers *et al.*, 1997; De Klerk *et al.*, 1999). Dabei hängt die Auxin-Wirkung nicht nur von der Art des applizierten Auxins ab, sondern auch von der verwendeten Konzentration. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass sich eine Behandlung mit geringen Indol-3-essigsäure (IAA)-Konzentrationen inhibierend und eine Behandlung mit höheren IAA-Konzentrationen fördernd auf die Bewurzelung von Stecklingen auswirkt (Eliasson, 1981; Nordström und Eliasson, 1984; Ludwig-Müller *et al.*, 2005). Im Vergleich dazu stimulieren das natürliche Auxin Indol-3-buttersäure (IBA) sowie die synthetisch hergestellten Auxine 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und 1-Naphthyllessigsäure (NAA) die Regeneration von Adventivwurzeln effektiver. So ist eine Regeneration von Adventivwurzeln auch bei Verwendung niedriger IBA- und 2,4-D-Konzentrationen nachgewiesen (Eliasson und Areblad, 1984; Nordström und Eliasson, 1984; Ludwig-Müller *et al.*, 2005). Auch die Anzahl der regenerierten Wurzeln pro Steckling ist nach Gabe von NAA und IBA im Vergleich zu einer IAA-Behandlung höher (James, 1983; Nordström *et al.*, 1991; Ludwig-Müller *et al.*, 2005).

Die Wirkung der Auxine hängt zugleich entscheidend von der Dauer und vom Zeitpunkt der Applikation ab. Diesbezüglich wurde der Prozess der Wurzelregeneration in eine Auxin-empfindliche Phase und in eine Phase mit geringer Auxin-Empfindlichkeit unterteilt (Shibaoka, 1971; Mohammed und Eriksen, 1974). Die Auxin-empfindliche Phase umfasst meist den Zeitraum vom Nachweis erster morphologischer Veränderungen bis zur Ausbildung erster Meristemoide (James, 1983). Das heißt, die Ausbildung von Adventivwurzeln wird am effektivsten gefördert, wenn die Applikation von Auxin direkt oder wenige Stunden nach der Stecklingsernte erfolgt (Kantharaj *et al.*, 1979; De Klerk *et al.*, 1995; Ludwig-Müller *et al.*, 2005). Eine spätere Auxin-Applikation wirkt sich eher inhibierend auf die Wurzelentwicklung aus (Jarvis *et al.*, 1983). Dies ist daran zu erkennen, dass sich im Bereich der Wurzelregenerationszone bevorzugt Kallus-Gewebe bildet, aus dem sich keine oder nur eine geringe Anzahl Wurzeln regeneriert (James, 1983).

Eine Applikation von Auxin ist für die Bewurzelung von Stecklingen verschiedener Spezies essentiell. Im Vergleich dazu regenerieren die Stecklinge anderer Spezies spontan und ohne zusätzliche Gabe von Wachstumsfaktoren Adventivwurzeln (Hausman *et al.*, 1997; De Klerk *et al.*, 1999). Dies liegt darin begründet, dass diese Pflanzen in Blättern, Knospen und im apikalen Bereich des Stecklings ausreichend endogenes Auxin synthetisieren. Dieses wird dann basipetal in die Wurzelregenerationszone des Stecklings transportiert und akkumuliert dort (Haissig, 1970; Garrido *et al.*, 2002). Werden die Auxin synthetisierenden Organe entfernt oder wird der basipetale Transport durch Anwendung geeigneter Inhibitoren unterbunden reduziert sich der Auxin-Gehalt in der Wurzelregenerationszone und es bilden sich nur wenige oder keine Adventivwurzeln an der Basis der Stecklinge aus (Liu und Reid, 1992a; Koukourikou-Petridou und Bangerth, 1997; Garrido *et al.*, 2002; Ludwig-Müller *et al.*, 2005). Dieser Effekt kann durch die Applikation von Auxin teilweise oder vollständig kompensiert werden (Koukourikou-Petridou und Bangerth, 1997; Garrido *et al.*, 2002).

Das in die Stecklingsbasis transportierte Auxin verbleibt nicht über den gesamten Zeitraum der Wurzelregeneration auf einem konstanten Niveau, sondern zeigt einen charakteristischen zeitlichen Verlauf. Direkt oder kurz nach der Ernte der Stecklinge akkumuliert freie IAA in der Wurzelregenerationszone und nach dem Durchlaufen eines Maximums fallen die Gehalte der freien IAA wieder auf das Ausgangsniveau. Eine Akkumulation der freien IAA ist meist vor oder während der ersten morphologischen Änderungen in der Wurzelregenerationszone nachzuweisen. Bis zur Ausbildung erster Primordien erreichen die Gehalte wieder ihr niedriges Ausgangsniveau (Gaspar *et al.*, 1990; Liu und Reid, 1992a; Koukourikou-Petridou und Bangerth, 1997). Die Gehalte der mit Aspartat konjugierten IAA (IAA-Asp) steigen denen der freien IAA zeitlich nachgelagert an, wobei sich der Abfall an freier IAA mit der Ausbildung des biologisch inaktiven IAA-Konjugates überschneidet (Moncousin *et al.*, 1988; Nordström und Eliasson, 1991).

1.2.2.2 Ethylen

Die Regeneration von Adventivwurzeln an Sprossen von mit Ethylen behandelten Pflanzen wurde erstmals 1933 beschrieben (Zimmerman und Hitchcock, 1933). Auch spätere Untersuchungen bestätigten diese Wirkung des Ethylens (Mudge, 1988). In Bezug auf die gezielte Bewurzelung von Stecklingen ist die Ethylen-Wirkung nicht so eindeutig belegt und wird in der Literatur konträr diskutiert (Mudge, 1988). So kann eine Behandlung von Stecklingen mit Ethylen bzw. Ethylen-freisetzenden Substanzen die Regeneration von Adventivwurzeln sowohl fördern als auch hemmen oder es ist keine nennenswerte Wirkung nachzuweisen (Andersen, 1977; Mudge, 1988).

Als Ursachen für diese widersprüchlichen Ergebnisse werden die Vielzahl an untersuchten Pflanzen-Spezies und auch die unterschiedlichen experimentellen Versuchsanordnungen und Bedingungen angeführt (Mudge, 1988). So wurden in den einzelnen Untersuchungen zum Beispiel verschiedene Arten der Ethylen-Applikation (Begasung mit Ethylen, Applikation von Ethylen-freisetzenden Substanzen) genutzt. Als Ethylen-freisetzende Substanzen finden meist 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) oder 2-Chloroethylphosphorsäure Verwendung. Letztere wird auch als Ethephon bezeichnet und besitzt die Fähigkeit, in Lösungen mit einem pH-Wert von über 3,5, Ethylen freizusetzen (Mudge und Swanson, 1978). ACC wiederum ist die direkte Biosynthese-Vorstufe von Ethylen und wird nach Aufnahme durch die Pflanze mit Hilfe der ACC-Oxidase (ACO) zu Ethylen umgesetzt (Bollmark und Eliasson, 1990; Bleecker und Kende, 2000).

Für die Wirkung des Ethylens scheinen aber auch die verwendeten Konzentrationen und der Zeitpunkt der Applikation von Bedeutung zu sein. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Behandlung von *Vigna radiata*- (Robbins *et al.*, 1983; Riov und Yang, 1989) oder *Helianthus annuus*-Stecklingen (Liu *et al.*, 1990) mit geringen Mengen von ACC die Anzahl der regenerierten Wurzeln erhöht. Im Vergleich dazu hat eine Behandlung von *Vigna radiata*- (Geneve und Heuser, 1983; Robbins *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 1990) oder *Pisum sativum*-Stecklingen (Nordström und Eliasson, 1984) mit hohen ACC- bzw. Ethephon-Konzentrationen eine reduzierte Wurzelanzahl zur Folge. Weiterhin ist es für die Bewurzelung von *Vigna radiata*-Stecklingen eher förderlich geringe ACC-Mengen über den gesamten Prozess der Wurzelregeneration zu applizieren oder die Stecklinge nur kurz (erstes Drittel der Wurzelregeneration) mit hohen ACC-Konzentrationen

zu behandeln (Riov und Yang, 1989). Die kurzzeitige Applikation von ACC wirkt sich auch auf die Bewurzelung von *Picea abies*-Stecklingen positiv aus. Eine spätere Applikation hat keinen nachweisbaren Effekt (Bollmark und Eliasson, 1990).

Neben der Wirkung von exogenem Ethylen spielen vor allem die endogenen Gehalte für die Regeneration von Adventivwurzeln eine Rolle. Die Ethylen-Gehalte in den Stecklingen variieren zwar in Abhängigkeit von der Pflanzen-Spezies, weisen jedoch einen charakteristischen Verlauf während der Wurzelregeneration auf. In der Literatur sind zum Beispiel für *Vitis riparia*-Stecklinge zwei transiente Anstiege beschrieben. Der erste Anstieg ist direkt nach der Ernte der Stecklinge nachzuweisen und wird mit der infolge der Ernte ausgelösten Verwundungsreaktion in Verbindung gebracht. Der zweite Anstieg im Ethylen-Gehalt verläuft ähnlich wie der bereits beschriebene Anstieg im IAA-Gehalt, weshalb man davon ausgeht, dass sich die Gehalte beider Phytohormone bedingen (Moncousin *et al.*, 1989; Gaspar *et al.*, 1990). Es gibt aber auch Untersuchungen in denen das Ethylen nur einmal transient akkumuliert. Der Gehalt an Ethylen steigt hier ebenfalls direkt nach der Ernte der Stecklinge an, durchläuft ein Maximum und erreicht meist bis zur Ausbildung erster Primordien das Ausgangsniveau (Coleman *et al.*, 1980; Bollmark und Eliasson, 1990; Liu *et al.*, 1990).

Der transiente Anstieg des endogenen Ethylens scheint essentiell zu sein. Durch die Verwendung geeigneter Inhibitoren, wie zum Beispiel Aminoethoxyvinylglycin [AVG, Inhibitor der Ethylen-Biosynthese; Adams und Yang (1979), Boller *et al.*(1979)] oder dem anionischen Silberthiosulfat (STS)-Komplex [Inhibitor der Ethylen-Wirkung, Beyer(1976)], wird die Ethylen-Freisetzung in den Stecklingen vermindert und daraus resultierend, reduziert sich die Anzahl der regenerierten Adventivwurzeln (Liu *et al.*, 1990; Gonzalez *et al.*, 1991; Lorbiecke und Sauter, 1999). Die Wirkung der Inhibitoren kann meist durch die Applikation von Ethylen-freisetzenden Substanzen aufgehoben werden (Robbins *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 1990; Gonzalez *et al.*, 1991).

Aber nicht nur die Menge des in der Pflanze freigesetzten Ethylens sondern auch die Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber Ethylen ist für die Regeneration von Adventivwurzeln von Bedeutung. Bei Stecklingen von Pflanzen mit verminderter Ethylen-Empfindlichkeit [transgene *Petunia hybrida* Pflanzen (Linie 44568; Wilkinson *et al.*, 1997) sowie die Mutante *Never ripe* [*Solanum lycopersicum*, Wilkinson *et al.*(1995)] ist die Regeneration von Adventivwurzeln gestört (Clark *et al.*, 1999; Shibuya *et al.*, 2004; Negi *et al.*, 2010). Eine zusätzliche Behandlung mit Ethylen-freisetzenden Substanzen zeigt diesbezüglich nur eine geringe oder gar keine Wirkung (Clark *et al.*, 1999).

1.2.2.3 Die interaktive Wirkung von Auxin und Ethylen

In einer Vielzahl von Untersuchungen geht man davon aus, dass die Ausbildung von Adventivwurzeln durch ein Zusammenspiel verschiedener Phytohormone reguliert wird. So induziert Auxin zwar die Zellteilung, aber ohne Ethylen erfolgt diese eher ungeordnet und es bilden sich keine Primordien aus. Dem gegenüber führt die Applikation von Ethylen ohne zusätzliche Gabe von Auxin zur Schwellung und Trennung von kortikalen und Mark-Zellen und es findet keine vermehrte Zellteilung statt (Linkins *et al.*, 1973).

Wie genau die beiden Phytohormone während der Wurzelregeneration miteinander interagieren, wird unterschiedlich diskutiert. Zum einen vermutet man, dass die stimulierende Wirkung des Auxins durch Ethylen vermittelt wird. Dies begründet man damit, dass nicht nur Ethylen-freisetzende Substanzen wie ACC oder Ethephon, sondern auch Auxine einen Anstieg der endogenen Ethylen-Gehalte bewirken können (Riov und Yang, 1989; Nordström und Eliasson, 1993; Visser *et al.*, 1996). Diesbezüglich wird auch der mit dem Auxin gleichzeitig oder etwas nachgelagerte Anstieg des endogenen Ethylens erwähnt. Eine positive Korrelation zwischen der Ethylen-Freisetzung bzw. dem Ethylen-Gehalt im pflanzlichen Gewebe und der Anzahl regenerierter Adventivwurzeln in Reaktion auf eine Auxin-Behandlung wurde jedoch bisher nicht nachgewiesen (Batten und Mullins, 1978; Coleman *et al.*, 1980; Geneve und Heuser, 1982). Auch eine Verminderung der Gehalte des durch eine Auxin-Behandlung freigesetzten Ethylens mit Hilfe geeigneter Inhibitoren hat keinen Einfluss auf die vermehrte Regeneration von Adventivwurzeln (Coleman *et al.*, 1980; Nordström und Eliasson, 1984; Visser *et al.*, 1996).

Als weitere Möglichkeit wird eine antagonistische Wirkung von Auxin und Ethylen erörtert. Man vermutet, dass die Regeneration von Wurzeln gefördert wird, wenn die endogenen Gehalte des Ethylens im Verhältnis zu den applizierten Auxin-Konzentrationen eher gering ausfallen (Mullins, 1970a). Sind die applizierten Auxin-Konzentrationen im Verhältnis zu den endogenen Ethylen-Gehalten zu gering, wirkt sich dies auf den fördernden Effekt des Auxins negativ aus. Das heißt, die fördernde Auxin-Wirkung kann durch den inhibierenden Effekt des Ethylens unterbunden werden. Eine vermehrte Regeneration von Adventivwurzeln infolge einer Auxin-Applikation wird auch dadurch inhibiert, dass die endogenen Gehalte an Ethylen durch die Applikation von Ethylen-freisetzenden Substanzen stark erhöht werden (Nordström und Eliasson, 1984; Jusaitis, 1986; Nordström und Eliasson, 1993).

Ferner nimmt man an, dass Ethylen die Auxin-Empfindlichkeit in der Pflanze beeinflusst und auf diesem Wege die Regeneration von Adventivwurzeln beeinträchtigt (Visser *et al.*, 1996; Smalle und Straeten, 1997; Shibuya *et al.*, 2004). Wird zum Beispiel die Freisetzung von Ethylen in der Pflanze durch die Anwendung von Inhibitoren zu stark inhibiert, hat dies eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber endogenem bzw. exogenem Auxin zur Folge und die Regeneration von Adventivwurzeln wird inhibiert (Robbins *et al.*, 1983; Robbins *et al.*, 1985; Jusaitis, 1986; Liu und Reid, 1992b). Dieser Effekt kann auch dadurch erreicht werden, dass die Signalwirkung des Ethylens unterbunden wird (Clark *et al.*, 1999; Shibuya *et al.*, 2004; Negi *et al.*, 2010).

1.2.2.4 Cytokinin und dessen Interaktion mit Auxin

In der Literatur weist man Cytokinin eine inhibierende Wirkung im Prozess der Wurzelentwicklung zu. Infolge einer Behandlung von Stecklingen mit natürlich vorkommenden oder synthetisch hergestellten Cytokininen wird die Initiation von Adventivwurzeln inhibiert (Kuroha *et al.*, 2006; Fabijan *et al.*, 1981; Bollmark und Eliasson, 1986; De Klerk *et al.*, 1995). Im Bereich der Wurzelregenerationszone bildet sich lediglich Kallus-Gewebe, aus dem sich nachfolgend keine Adventivwurzeln regenerieren (Humphries, 1960; De Klerk *et al.*, 1995). Histologische Untersuchungen konnten belegen, dass Cytokinin die Differenzierung der Meristemoide verhindert (Bollmark und

Eliasson, 1986). Eine Applikation von Cytokinin wirkt sich jedoch nicht über den gesamten Prozess der Wurzelregeneration inhibierend aus. Nur eine Behandlung während der Initiationsphase (Zeitpunkt erster morphologischer Veränderungen bis zur Ausbildung von Meristemoiden) führt zur verminderten Ausbildung von Adventivwurzeln (Fabijan *et al.*, 1981; De Klerk *et al.*, 1995). Eine spätere Cytokinin-Applikation hat nur noch eine geringe oder keine Wirkung (Eriksen, 1974; Bollmark und Eliasson, 1986).

Die endogenen Gehalte des Cytokinins fallen in Stecklingen von *Solanum lycopersicum* (Maldiney *et al.*, 1986), *Pisum sativum* (Bollmark *et al.*, 1988) und *Populus* (Okoro und Grace, 1978; Hausman *et al.*, 1997) direkt nach der Ernte stark ab und verbleiben bis zur Entwicklung erster Primordien auf einem niedrigen Niveau (Bollmark und Eliasson, 1990). Im Vergleich dazu steigen die endogenen Gehalte des Auxins während dieser Entwicklungsphase an (siehe 1.2.2.1). Man vermutet, dass sich das Verhältnis viel Auxin zu wenig Cytokinin günstig auf die Regeneration von Adventivwurzeln auswirkt (De Klerk *et al.*, 1997). Wird das optimale Verhältnis Auxin zu Cytokinin in den Stecklingen verändert, hat das einen direkten Einfluss auf die Wurzelregeneration (Koukourikou-Petridou und Bangerth, 1997). So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass die infolge einer Auxin-Behandlung erhöhte Anzahl von Adventivwurzeln durch eine Applikation von hohen Cytokinin-Konzentrationen reduziert wird (Humphries, 1960; Heide, 1965). Im Vergleich dazu wirkt sich eine Behandlung mit hohen Auxin- bzw. geringen Cytokinin-Konzentrationen stimulierend auf die Regeneration von Adventivwurzeln aus (Heide, 1965; De Klerk *et al.*, 1995).

1.2.2.5 Gibberellin und Abscisinsäure (ABA)

Gibberelline inhibieren in verschiedenen Spezies die Regeneration von Adventivwurzeln (Fernqvist, 1966; Jarvis, 1986; Gaspar und Coumans, 1987), wobei der Zeitraum vor der Initiation der Primordien am empfindlichsten gegenüber einer Gibberellin-Behandlung ist (Fabijan *et al.*, 1981). Indessen hat eine Applikation von Gibberellin-Antagonisten bzw. -Inhibitoren, wie zum Beispiel 2-Chloroethyltrimethylammoniumchlorid, 2-Isopropyl-4-dimethylamino-5-methylphenyl-1-piperidincarboxylatmethylchlorid sowie α -Cyclopropyl- α -(4-methoxyphenyl)-5-pyrimidinmethanol, eine vermehrte Regeneration von Adventivwurzeln zur Folge (Libbert und Krelle, 1966; Kefford, 1973; Fabijan *et al.*, 1981). Diese stimulierende Wirkung der Gibberellin-Antagonisten bzw. -Inhibitoren kann durch die gleichzeitige Gabe von Gibberellin wieder aufgehoben werden (Kefford, 1973; Fabijan *et al.*, 1981). Zu den endogenen Gehalten des Gibberellins während der Stecklingsbewurzelung stehen bisher noch keine Daten zur Verfügung.

Welche Rolle ABA im Prozess der Wurzelregeneration zukommt, ist nicht eindeutig belegt. Infolge einer ABA-Behandlung von *Phaseolus aureus*-, *Phaseolus coccineus*- bzw. *Solanum lycopersicum*-Stecklingen steigt die Anzahl der regenerierten Adventivwurzeln in Abhängigkeit von der Konzentration an (Chin *et al.*, 1969; Basu *et al.*, 1970; Hartung *et al.*, 1980). Dabei scheint die Dauer der Applikation keine Rolle zu spielen. Der stimulierende Effekt war sowohl nach einer kurzen Applikation direkt nach der Stecklingsernte als auch nach einer ABA-Behandlung über den gesamten Bewurzelungszeitraum nachzuweisen (Chin *et al.*, 1969; Basu *et*

al., 1970; Hartung *et al.*, 1980). Im Vergleich dazu wirkt sich eine ABA-Behandlung von *Begonia*- bzw. *Cucumis melo*-Stecklingen inhibierend auf die Wurzelregeneration aus (Heide, 1968; Krishnamoorthy, 1972) und die Bewurzelung von *Phaseolus vulgaris*-Stecklingen wird nicht beeinflusst (Basu *et al.*, 1970). Auch der transiente Anstieg der endogenen ABA-Gehalte direkt nach der Stecklingsernte (Maldiney *et al.*, 1986; Hausman *et al.*, 1997) weist noch nicht zwangsläufig auf einen Einfluss der ABA hin. Man vermutet, dass der erhöhte Gehalt von ABA eher mit dem infolge der Stecklingsernte verursachten Wasser- bzw. Trockenstress zusammenhängt, als mit der Regeneration von Adventivwurzeln (Maldiney *et al.*, 1986; Kevers *et al.*, 1997).

1.3 Die Jasmonate

Jasmonsäure (JA) und die von ihr abgeleiteten natürlich vorkommenden Verbindungen fasst man unter dem Begriff Jasmonate zusammen. Jasmonate kommen im Reich der Pflanzen ubiquitär vor und sind sowohl in Bedeckt- und Nacktsamern als auch in Algen, Farnen und Pilzen nachzuweisen (Meyer *et al.*, 1984; Sembdner und Parthier, 1993). Es handelt sich um pflanzenspezifische Signalstoffe, die den tierischen Steroiden und Prostaglandinen in Bezug auf Struktur und Funktion ähneln (Bergey *et al.*, 1996) und aufgrund ihrer Wirkungsweise den Phytohormonen zugeordnete werden.

Die Jasmonate sind an einer Vielzahl von pflanzlichen Entwicklungsprozessen, wie zum Beispiel an der Blütenentwicklung (McConn und Browse, 1996; Stintzi und Browse, 2000; Li *et al.*, 2004), dem Wurzel- und Knollenwachstum (Dathe *et al.*, 1981; Yoshihara *et al.*, 1989; Staswick *et al.*, 1992), dem Winden von Ranken (Falkenstein *et al.*, 1991) sowie der Seneszenz (Ueda und Kato, 1980) beteiligt. Ferner können sie die Anpassung der Pflanze an wechselnde Umgebungsbedingungen beeinflussen. In der pflanzlichen Reaktion auf abiotischen Stress [Wassermangel (Pedranzani *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009), Belastung durch Ultraviolette Strahlung (Fedina *et al.*, 2009; Demkura *et al.*, 2010) oder Ozon (Rao *et al.*, 2000), osmotischer Stress (Kramell *et al.*, 1995) usw.] spielen die Jasmonate ebenso eine Rolle wie auch in der gegenüber biotischem durch Insekten und nekrotrophe Pathogene ausgelöstem Stress (Wasternack *et al.*, 2006; Howe und Jander, 2008; Koo und Howe, 2009). Eine der am umfangreichsten untersuchten Prozesse, in denen die Jasmonate regulierend eingreifen, ist die Reaktion der Pflanze auf Verwundung (Schillmiller und Howe, 2005; Wasternack *et al.*, 2006; Koo und Howe, 2009).

1.3.1 Die Biosynthese der Jasmonate und deren Regulation

1.3.1.1 Der Lipoxygenase (LOX)-Biosynthese-Weg

Die unter dem Begriff Oxylipine zusammengefassten oxidierten Fettsäuren und deren Derivate sind lipophile Signalmoleküle, die Funktionen sowohl in der pflanzlichen Entwicklung als auch in der Abwehr der Pflanze gegenüber abiotischen und biotischen Stress übernehmen (Blée, 2002; Feussner und Wasternack, 2002). Die Umwandlung von Fettsäuren in Fettsäure-Hydroperoxide kann chemisch durch Autooxidation (Mueller, 2004) oder enzymatisch durch eine α -Dioxygenase (Hamberg *et al.*, 2005) bzw. durch eine LOX-Aktivität (Feussner und Wasternack, 2002) erfolgen.

Letztere katalysiert die stereospezifische Insertion von molekularem Sauerstoff entweder in Position C9 (9-LOX) oder C13 (13-LOX) (Schneider *et al.*, 2007). Die so entstandenen 9(S)- bzw. 13(S)-Hydroperoxy-Fettsäuren können dann durch verschiedene Enzyme weiter metabolisiert werden. Zurzeit sind sieben mögliche Wege für Folgereaktionen beschrieben: der Divinylether-Synthase-, Hydroperoxid-Lyase-, Peroxygenase-, Epoxyalkohol-Synthase-, Reduktase-, LOX- sowie der Allenoxid-Synthase-Weg (Feussner und Wasternack, 2002).

Die Jasmonsäure und ihre Derivate werden ebenfalls den Oxylipinen zugeordnet und leiten sich von der mehrfach ungesättigten Fettsäure α -Linolensäure (18:3) ab (Abbildung 1-2). Diese wird infolge lokaler oder systemischer Signale (Farmer und Ryan, 1992; Conconi *et al.*, 1996; Narvaez-Vasquez *et al.*, 1999) durch die hydrolytische Aktivität einer Phospholipase A₂ (Narvaez-Vasquez *et al.*, 1999) oder einer DAD1-ähnlichen Phospholipase A₁ (Ishiguro *et al.*, 2001) von der Chloroplasten-Membran freigesetzt und anschließend durch die 13-LOX an Position C13 oxygeniert. Als Produkt entsteht das Hydroperoxid 13(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure (13-HPOT) (Wasternack und Hause, 2002; Delker *et al.*, 2006; Wasternack, 2007).

1.3.1.2 Der Allenoxid-Synthase (AOS)-Weg: Die Jasmonat-Biosynthese

Der AOS-Weg wird auch als Jasmonat-Biosynthese bezeichnet und wurde in den 1980er Jahren durch Vick und Zimmerman (Vick und Zimmerman, 1984) sowie Hamberg und Hughes (Hamberg und Hughes, 1988) erstmals beschrieben (Abbildung 1-2). Der initiale Schritt der Jasmonat-Biosynthese wird durch die AOS katalysiert, wobei das durch die LOX generierte 13-HPOT als Substrat dient. Infolge der Dehydrierung von 13-HPOT durch die AOS entsteht ein instabiles Epoxid 12,13-Epoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure (12,13-EOT), welches in wässriger Lösung zu α - und γ -Ketol hydrolysiert. Zugleich bildet sich infolge einer spontanen Cyclisierung ein racemisches Gemisch von 12-Oxo-10,15(Z)-phytodienensäure (OPDA)-Enantiomeren (Brash *et al.*, 1988; Hamberg und Fahlstadius, 1990). Der spontane Abbau von 12,13-EOT kann durch die Allenoxid-Cyclase (AOC) verhindert werden. Sie setzt das instabile Epoxid zum biologisch aktiven Intermediat (9S,13S)-OPDA um und etabliert zugleich die enantiomere Grundstruktur der natürlich vorkommenden Jasmonate (Hamberg und Fahlstadius, 1990). Während die Umwandlung von α -Linolensäure zu OPDA im Plastid lokalisiert ist, finden alle weiteren Schritte der Jasmonat-Biosynthese im Peroxisom statt. Der genaue Mechanismus des OPDA-Transports ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Man geht jedoch von zwei möglichen Transportwegen aus. Einerseits nimmt man an, dass OPDA in den Plastiden durch die Übertragung einer Acylgruppe aktiviert und dann in Form eines Coenzym A (CoA)-Esters durch den in der peroximalen Membran lokalisierten ABC-Transporter COMATOSE [Theodoulou *et al.*, 2005; auch als PXA1 (Zolman *et al.*, 2001) oder PED3 (Hayashi *et al.*, 2002) bekannt] transportiert wird. Andererseits könnte OPDA auch in Form von OPDA^H mittels Ionenfall-Prinzip in das Peroxisom gelangen (Theodoulou *et al.*, 2005) und dort durch spezifische Fettsäure-CoA-Synthetasen aktiviert werden (Schneider *et al.*, 2005; Koo *et al.*, 2006; Kienow *et al.*, 2008). Im Peroxisom katalysiert eine 9(S),13(S)-OPDA spezifische OPDA-Reduktase (Isoenzym 3: OPR3) die Umwandlung von OPDA zu 3-oxo-2-(2'(Z)-pentenyl)-cyclopentan-1-oktansäure (OPC-8), welche dann drei Zyklen β -Oxidation durchläuft.

Dabei umfasst jeder β -Oxidation-Zyklus drei aufeinanderfolgende Enzym-Aktivitäten: eine Acyl-CoA-Oxidase (ACX)- (Castillo *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Schillmiller *et al.*, 2007), ein multifunktionales Protein (MFP)- (Delker *et al.*, 2007) und eine L-3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (KAT)-Aktivität (Castillo *et al.*, 2004). Aus der OPC-8 entsteht auf diesem Weg 3(*R*),7(*S*)-Jasmonsäure [(+)-7-*iso*-JA], die dann größtenteils zur thermodynamisch stabileren 3(*R*),7(*R*)-Jasmonsäure [(-)-JA] isomerisiert.

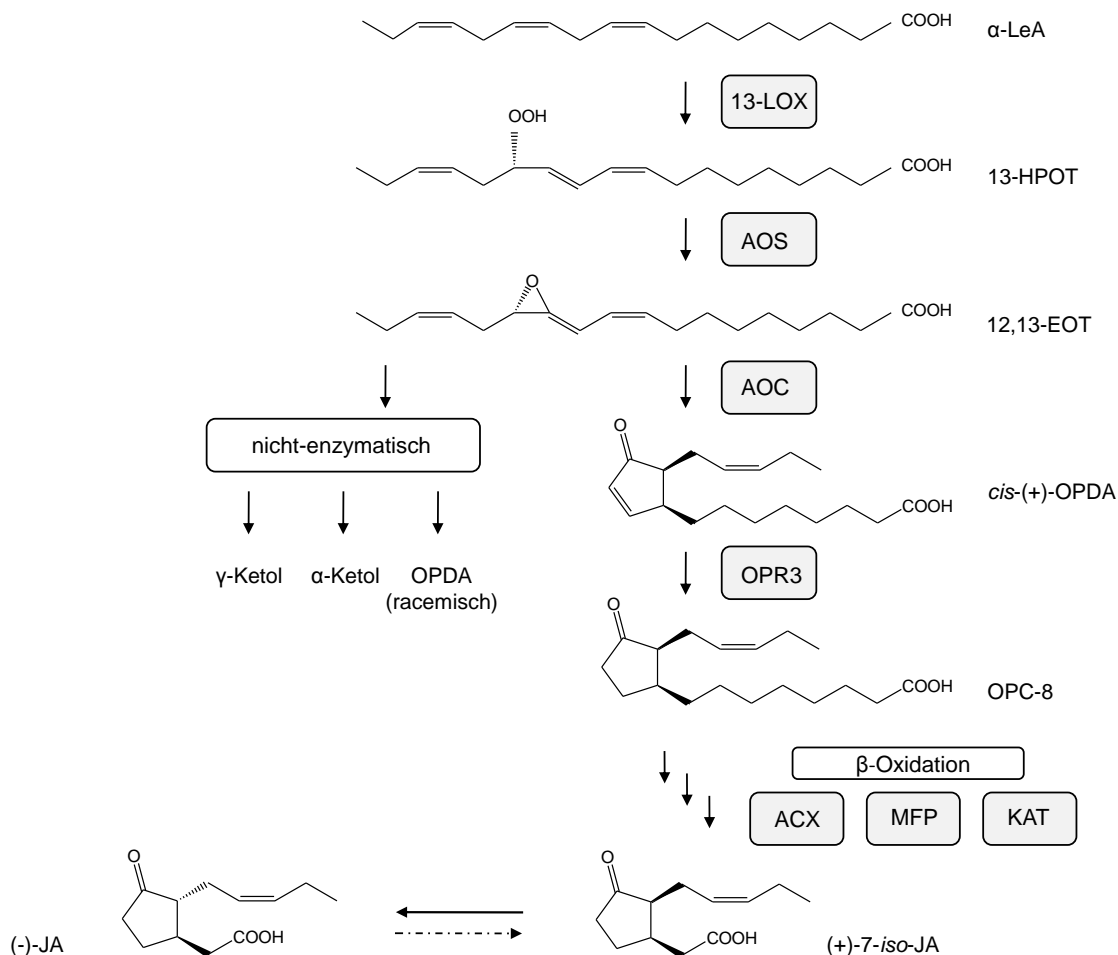


Abbildung 1-2: Der schematische Ablauf der Jasmonat-Biosynthese. Die α -Linolensäure (α -LeA) wird nach der Freisetzung aus der Chloroplasten-Membran durch **13-LOX**, **AOS** und **AOC** zum biologisch aktiven Intermediat 9(*S*),13(*S*)-OPDA [**cis-(+)-OPDA**] umgesetzt. Nach der Reduktion von OPDA durch die **OPR3** und dem Durchlaufen von drei Zyklen der **β -Oxidation** bildet sich 3(*R*),7(*S*)-JA [**(+)-7-*iso*-JA**], die dann größtenteils zur thermodynamisch stabileren 3(*R*),7(*R*)-JA [**(-)-JA**] isomerisiert. Die Abbildung wurde nach Wasternack (2007) verändert.

1.3.1.3 Die Metabolisierung der JA

Neben JA und OPDA sind auch von der JA abgeleitete Verbindungen in der Pflanze nachweisbar. Bisher sind sieben verschiedene Reaktionswege beschrieben, über die die JA weiter metabolisiert werden kann.

- Methylierung der Carboxylgruppe mittels JA-spezifischen Methyltransferasen zu Methyl-JA (Seo *et al.*, 2001)
- Decarboxylierung zu *cis*-Jasmon (Koch *et al.*, 1997)
- Adenylierung der Carboxyl-Gruppe mittels einer AMP-Transferase (Staswick *et al.*, 2002) und die nachfolgende Aminosäure (AS)-Konjugation mittels einer JA konjugierenden-Synthetase (JAR1) (Staswick und Tiriyaki, 2004)
- Hydroxylierung an Position C11 oder C12 der Pentenylseitenkette zu 11- bzw. 12-Hydroxyjasmonsäure (11-OH-JA bzw. 12-OH-JA) und der nachfolgenden O-Glykosylierung zu 12-O- β -D-glucopyranosyljasmonsäure (Sembdner und Parthier, 1993; Swiatek *et al.*, 2004) bzw. Sulfatierung zu 12-Hydroxysulfonyloxyjasmonsäure (12-HSO₄-JA) (Gidda *et al.*, 2003)
- Ausbildung von Jasmonoyl-1- β -Glucose, Jasmonoyl-1- β -Gentiobiose und Hydroxyjasmonoyl-1- β -Glucose (Swiatek *et al.*, 2004)
- Ausbildung von Cucurbinsäure infolge der Reduzierung an der Keto-Gruppe des Cyclopentanonrings (Sembdner und Parthier, 1993)
- Konjugation mit der Ethylen-Vorstufe ACC zu JA-ACC (Staswick und Tiriyaki, 2004)

Sowohl die Gehalte an JA und OPDA als auch die der JA-Derivate variieren in den verschiedenen Pflanzen-Spezies in Abhängigkeit von der Entwicklungsstufe und dem untersuchten Gewebe. Auch die vorherrschenden Umweltbedingungen können die Gehalte der einzelnen Substanzen beeinflussen (Hause *et al.*, 2000; Miersch *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Variabilität im Vorkommen geht man davon aus, dass den einzelnen Verbindungen unterschiedliche Funktionen und Signaleigenschaften zuzuordnen sind. So induziert zum Beispiel 12-OH-JA in *Solanum tuberosum* die Knollenbildung (Yoshihara *et al.*, 1989) und Methyl-JA scheint eine Rolle in der Pathogen-Abwehr zu spielen (Seo *et al.*, 2001). Die genaue Funktionsweise bzw. der Mechanismus der Signalerkennung in der Pflanze ist bisher nur für das AS-Konjugat JA-Isoleucin (JA-Ile) beschrieben (siehe 1.3.2).

1.3.1.4 Die Regulation der Jasmonat-Biosynthese

Die Jasmonat-Biosynthese kann über drei verschiedene Mechanismen reguliert werden (Delker *et al.*, 2006; Wasternack, 2007). Als eine erste Möglichkeit ist die Regulation über die Substratverfügbarkeit beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass in voll entwickelten *Arabidopsis*-Blättern LOX, AOS- sowie AOC-Aktivität nachzuweisen ist, eine Synthese der JA jedoch erst nach Verwundung und der daraus resultierenden Freisetzung von α -Linolensäure stattfindet (Laudert und Weiler, 1998; Stenzel *et al.*, 2003b). Und auch in transgenen Pflanzen, die für die Jasmonat-Biosynthese wichtige Enzyme wie AOS oder AOC konstitutiv überexprimieren, akkumuliert JA nur nach einem Stimulus (Laudert *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003a).

Weiterhin geht man von einem Regulationsmechanismus der positiven Rückkopplung aus, da die Expression aller Gene, die für an der Jasmonat-Biosynthese beteiligte Enzyme kodieren, durch JA induziert werden können (Reymond *et al.*, 2000; Stenzel *et al.*, 2003b; Castillo *et al.*, 2004). Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass in Mutanten mit dauerhaft erhöhten Jasmo-

nat-Gehalten (z.B. *cev1*, *constitutive expression of VSP1*, Devoto *et al.*, 2002) eine verstärkte Expression der AOC und in Mutanten mit dauerhaft reduzierten Jasmonat-Gehalten (z.B. *opr3*) eine verminderte Expression der AOC sowie geringere Mengen an AOC-Protein nachzuweisen sind. Dieser positive Rückkopplungsmechanismus scheint jedoch eher in pflanzlichen Entwicklungsprozessen eine Rolle zu spielen (Stenzel *et al.*, 2003b; Wasternack, 2007).

Die Biosynthese der Jasmonate kann aber auch durch das Gewebe-spezifische Vorkommen der an der Jasmonat-Biosynthese beteiligten Enzyme beeinflusst werden. Im Modellsystem *Solanum lycopersicum* ist die AOC in den Geleitzellen und den Siebelementen des Phloems lokalisiert. Und auch für AOS und LOX ist ein spezifischer Nachweis in den Siebelementen möglich (Hause *et al.*, 2003a). Dementsprechend wird die JA infolge eines Verwundungsreizes bevorzugt im Leitgewebe synthetisiert, ist kurze Zeit später aber auch in anderen Geweben des verwundeten Blattes nachzuweisen (Mielke *et al.*, 2011). In *Arabidopsis* wiederum ist das Vorkommen von LOX, AOS und AOC zum Beispiel im Blatt nicht auf ein bestimmtes Gewebe festgelegt (Stenzel *et al.*, 2003b). Die Gewebe-spezifische Akkumulation der Jasmonate wird dadurch erreicht, dass die Aktivitäten der AtAOC-Promotoren und somit die Expression der vier für die AtAOCs kodierenden Gene zeitlich und räumlich variieren (Stenzel *et al.*, 2003b; Delker *et al.*, 2006, persönliche Mitteilung Stenzel und Wasternack)

1.3.2 Der Mechanismus der Jasmonat-Erkennung in der Pflanze

Eine biologische Wirksamkeit wurde für OPDA und JA aber auch für von der JA-abgeleitete Verbindungen beschrieben (Wasternack, 2007). Bisher ist allerdings nur für JA-Ile der Mechanismus der Signal-Erkennung in der Pflanze bekannt (Abbildung 1-3; Thines *et al.*, 2007; Katsir *et al.*, 2008; Melotto *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2009). Für die Erkennung von JA-Ile ist der COI1 (*CORONATINE INSENSITIVE1*)-Rezeptor (Katsir *et al.*, 2008; Melotto *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009) bzw. der COI1-JAZ-Rezeptor-Komplex (Sheard *et al.*, 2010) essentiell. Bei COI1 handelt es sich um ein F-Box Protein (Xie *et al.*, 1998), welches mit SKP1, RBX1 und Cullin1 interagiert, um den SCF (Skip/Cullin/F-Box)^{COI1}-Komplex zu bilden. Dabei repräsentiert dieser Komplex eine Klasse von E3-Ubiquitin-Ligasen im Ubiquitin/26S Proteasom Reaktionsweg (del Pozo und Estelle, 2000; Xu *et al.*, 2002). Die COI1-Untereinheit des SCF^{COI1}-Komplexes hat die Funktion, entsprechende Zielproteine für die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse zu binden (del Pozo und Estelle, 2000; Moon *et al.*, 2004; Browse, 2009). Als Zielmoleküle wurden die JAZ (*Jasmonate ZIM-domain*)-Proteine identifiziert (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). JAZ Proteine enthalten eine im Zentrum des Proteins lokalisierte hoch konservierte ZIM Domäne (*Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristem*; Vanholme *et al.*, 2007) sowie ein ebenfalls hoch konserviertes Jas-Motiv (*Jasmonate-associated*) im C-terminalen Bereich (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007). Sie bilden meist hetero- oder homodimere Strukturen aus, wobei die Dimerisierung über die ZIM-Domäne vermittelt wird (Chung und Howe, 2009). In Bezug auf das Jas-Motiv nahm man an, dass dieses für die Bindung von JAZ-Protein und COI1-Untereinheit unerlässlich ist (Katsir *et al.*, 2008; Melotto *et al.*, 2008; Chung und Howe, 2009). Mit Hilfe von Liganden-Bindungsstudien wurde dies bestätigt. So konnte man zeigen, dass eine 25 AS große das Jas-Motiv umfassende Sequenz des JAZ1-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* mit COI1 inter-

agiert und dass diese AS-Sequenz als JAZ-Degron fungiert (Sheard *et al.*, 2010). Aber auch die Interaktion von JAZ-Protein und Transkriptionsfaktoren wie MYC2 erfolgt über den C-terminalen Bereich (Chini *et al.*, 2007). MYC2 reguliert die Expression verschiedener Jasmonat-induzierbarer Gene (Lorenzo *et al.*, 2004). Infolge einer Bindung von JAZ-Protein und MYC2 wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors beeinträchtigt und somit die Expression dieser Gene behindert (Chini *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2008; Melotto *et al.*, 2008; Chung und Howe, 2009). Eine vermehrte Bildung von JA-Ile führt zur Interaktion von JAZ-Protein und COI1-Untereinheit des SCF^{COI1}-Komplexes. Folglich kommt es zur Ubiquitinierung und somit zum Abbau der JAZ-Proteine durch das 26S Proteasom (Thines *et al.*, 2007). MYC2 bzw. andere noch nicht identifizierte Transkriptionsfaktoren werden frei und können die Expression der entsprechenden Ziel-Gene induzieren. Da MYC2 auch die Expression der für die JAZ-Proteine kodierenden Gene reguliert, kann dies zur Wiederherstellung des Zustandes vor der JA-Ile Freisetzung führen (negative Rückkopplung; Chini *et al.*, 2007).

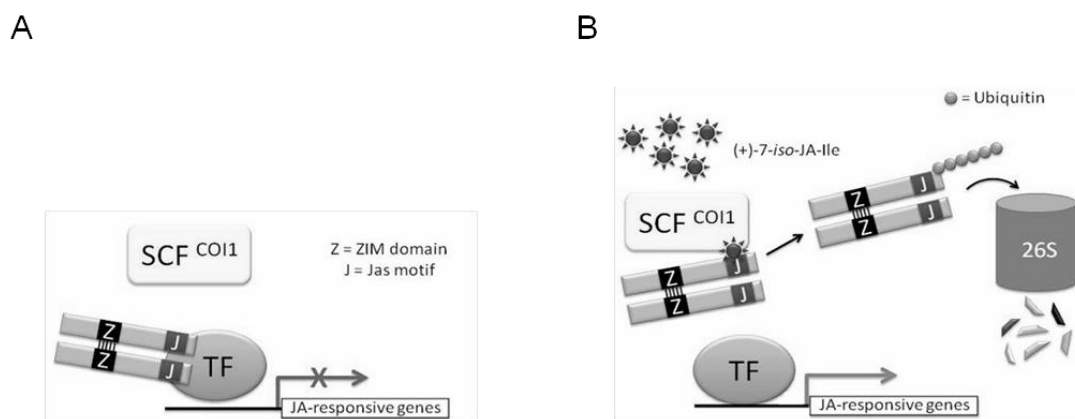


Abbildung 1-3: Mechanismus der JA-Ile-Erkennung in der Pflanze. **(A)** Vor der Freisetzung von JA-Ile binden JAZ-Proteine an den entsprechenden Transkriptionsfaktor und unterbinden dadurch die Expression Jasmonat-induzierbarer Gene (*JA-responsive genes*). **(B)** Die vermehrte Freisetzung von JA-Ile fördert die Interaktion von JAZ-Protein und SCF^{COI1}-Komplex. Dies hat die Ubiquitinierung und somit den Abbau der JAZ-Proteine durch das 26S Proteasom zur Folge. Der Transkriptionsfaktor wird frei und kann die Expression der entsprechenden Ziel-Gene induzieren. Die Abbildung wurde nach Acosta und Farmer (2010) modifiziert.

1.3.3 Die Reaktion der Pflanze auf Verwundung und die Rolle der Jasmonate in diesem Prozess

Viele Insekten und Tiere (Herbivoren) ernähren sich hauptsächlich von Pflanzenteilen, wie Blättern oder Wurzeln. Folglich wird die entsprechende Pflanze durch die Nahrungsaufnahme beschädigt und verwundet. Pflanzen reagieren auf mechanische bzw. auf durch Herbivoren verursachte Verwundung mit verschiedenen direkten und indirekten Abwehrmechanismen (Dicke *et al.*, 2003; Wasternack *et al.*, 2006; Heil, 2008; Howe und Jander, 2008; Koo und Howe, 2009).

Dabei hat die direkte Abwehr eine unmittelbare Schädigung der Fraßfeinde zur Folge (Walling, 2000) und umfasst unter anderem:

- die Synthese von Abwehr-Proteinen [Proteinase-Inhibitoren (PI), Leucin-Aminopeptidasen (LAP), Threonin-Deaminasen bzw. Threonin-Arginasen], die die Verdauung der Herbivoren stören oder aber die Qualität der durch die Herbivoren aufgenommenen Nahrung mindern (Chen *et al.*, 2005) sowie
- die Synthese von toxischen Verbindungen (z.B. Nikotin).

Im Vergleich dazu beeinflusst eine Freisetzung von flüchtigen Verbindungen (z.B. Blatt-Aldehyde, Blatt-Alkohole, Monoterpene sowie Diterpene) bzw. die Bildung von extrafloralem Nektar die Herbivoren nicht direkt, sondern lockt deren natürliche Feinde wie Wespen, Milben oder Ameisen an (Takabayashi und Dicke, 1996; Walling, 2000; Heil und McKey, 2003). Man spricht in diesem Zusammenhang von einer indirekten Abwehr (Heil, 2008).

In allen diesen Reaktionen der Pflanze auf den Verwundungsreiz kommt den Jasmonaten eine wesentliche Rolle zu. Sie sind in der Lage ein breites Spektrum an Abwehrreaktionen, wie die Synthese von PIs (Farmer und Ryan, 1990; Farmer *et al.*, 1992; Farmer und Ryan, 1992) oder Nikotin (Baldwin *et al.*, 1997), die Freisetzung von flüchtigen Verbindungen (Rodriguez-Saona *et al.*, 2001; Kappers *et al.*, 2010), die Ausbildung von Trichomen (Li *et al.*, 2004) oder die Segregation von extrafloralem Nektar zu induzieren (Heil *et al.*, 2001; Radhika *et al.*, 2010). Aber auch andere Signalmoleküle, wie zum Beispiel Systemin bzw. Systemin-ähnliche Peptide (Pearce *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 2001; Rocha-Granados *et al.*, 2005; Pearce *et al.*, 2007), ABA (Pena-Cortes *et al.*, 1995; Herde *et al.*, 1996), Ethylen (O'Donnell *et al.*, 1996), reaktive Sauerstoffspezies (Orozco-Cardenas und Ryan, 1999; Orozco-Cardenas *et al.*, 2001), Oligogalakturonide (Doares *et al.*, 1995) und Fettsäure-Derivate (Turlings *et al.*, 1995) sind an den pflanzlichen Abwehrreaktionen beteiligt und können die Signalwirkung der Jasmonate beeinflussen.

1.3.3.1 Die Reaktionen im verwundeten Gewebe

Infolge einer Schädigung der Pflanze durch Herbivoren oder nach mechanischer Verwundung wird in *Solanum lycopersicum* ein als Systemin bezeichnetes Signal-Peptid durch hydrolytische Abspaltung von dessen Peptid-Vorstufe (Prosystemin) freigesetzt (McGurl *et al.*, 1992). Auch in anderen Spezies konnten in der Funktion dem Systemin-ähnliche Peptide identifiziert werden (Pearce *et al.*, 2001; Rocha-Granados *et al.*, 2005; Pearce *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008). Die Interaktion von Systemin mit dem Systemin-Rezeptor SR160 (Scheer und Ryan, 2002; Scheer *et al.*, 2003) induziert eine Kaskade von intrazellulären Ereignissen. So kommt es innerhalb weniger Minuten zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was durch eine Depolarisierung der Plasmamembran, einen Anstieg der extrazellulären Protonen-Konzentration sowie eine Inaktivierung der in der Plasmamembran lokalisierten H^+ -ATPase begleitet wird. Diese Änderungen haben die Aktivierung einer *mitogen-activated protein*-Kinase zur Folge (Ryan, 2000). Gleichzeitig wird die Expression von *Calmodulin* (*CaM*) induziert (Bergey und Ryan, 1999) und es kommt zur Aktivierung der Phospholipase A_2 (Narvaez-Vasquez *et al.*, 1999). Letztere setzt das Substrat der

Jasmonat-Biosynthese α -Linolensäure aus der Plastiden-Membran frei (Conconi *et al.*, 1996) und es erfolgt die schnelle Umsetzung des Substrats in OPDA und JA (siehe auch 1.3.1). JA und die von ihr abgeleiteten Verbindungen sind wiederum in der Lage eine Vielzahl von Genen zu beeinflussen. So wird zum Beispiel die Expression von *Prosystemin* (McGurl *et al.*, 1992), *CaM* (Bergey und Ryan, 1999), *LOX* (Royo *et al.*, 1996; Heitz *et al.*, 1997), *AOS* (Laudert *et al.*, 1996), *AOC* (Stenzel *et al.*, 2003a), *Pis* (Farmer *et al.*, 1992), *LAP* (Chao *et al.*, 1999) usw. induziert.

1.3.3.2 Die systemischen Reaktionen

Eine Besonderheit in der Reaktion der Pflanze auf Verwundung besteht darin, dass nicht nur im geschädigten Gewebe Abwehrprozesse stattfinden, sondern dass Reaktionen wie die Synthese von PIs auch in unverwundeten Teilen der Pflanze nachzuweisen sind (Green und Ryan, 1972). Als mögliche systemische Signalmoleküle werden die JA und von ihr abgeleitete Verbindungen vorgeschlagen (Schillmiller und Howe, 2005). Mit Hilfe von Pfropfungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die systemische Abwehr von der Systemin-Erkennung und der nachfolgenden Aktivierung der Jasmonat-Biosynthese im verwundeten Blatt abhängig ist (Li *et al.*, 2002; Lee und Howe, 2003; Li *et al.*, 2005). Im unverwundeten Bereich der Pflanze scheinen eher die Jasmonat-Erkennung und die dadurch ausgelöste Signalweiterleitung für die Aktivierung von Abwehrmechanismen essentiell zu sein (Li *et al.*, 2002).

Man geht davon aus, dass die im verwundeten Gewebe synthetisierten Jasmonate über das Phloem in andere Teile der Pflanze transportiert werden. Eine vermehrte Akkumulation von JA im Leitgewebe von *Solanum lycopersicum* (Stenzel *et al.*, 2003a) und der spezifische Nachweis der an der Jasmonat-Biosynthese beteiligten Enzyme im Phloem (Hause *et al.*, 2000; Hause *et al.*, 2003a) stützen diesen Annahme. Aber auch die Geschwindigkeit, mit der Substanzen über das Phloem transportiert werden können, würde in den zeitlichen Rahmen passen, innerhalb derer systemische Reaktionen, wie die Induktion der *LAP*- (Strassner *et al.*, 2002) oder *PI*-Expression (Howe *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002), stattfinden (Schillmiller und Howe, 2005).

Andere Reaktionen sind im unverwundeten Teil der Pflanze wesentlich schneller nachzuweisen. So akkumuliert zum Beispiel JA und JA-Ile bereits innerhalb von fünf bis 15 Minuten nach Verwundung (Glauser *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009). Dabei werden JA und JA-Ile nicht in den unverwundeten Bereich der Pflanze transportiert, sondern dort *de novo* synthetisiert (Wang *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2009). Durch welche Signalmoleküle diese schnelle Reaktion induziert wird, ist noch nicht geklärt. Zum einen geht man von einer Beteiligung physikalischer Größen (Änderung des hydraulischen Drucks oder elektrischer Potentiale) aus (Koo *et al.*, 2009; Koo und Howe, 2009). Aber auch flüchtige, von der Pflanze emittierte Verbindungen kommen als Vermittler in Frage (Heil und Ton, 2008).

Das sehr schnelle Auslösen einer systemischen Reaktion kann je nach Stärke des Signals entweder zur direkten Aktivierung der Abwehr führen oder das entsprechende Gewebe sensibilisieren, sodass die Empfindlichkeit gegenüber langsamer transportierten Signalmolekülen steigt. Dies hätte eine verstärkte Abwehrreaktion zur Folge. Dieser Zwei-Schritt-Mechanismus ermöglicht es der Pflanze, zwischen tatsächlichen Bedrohungen und Fehlmeldungen zu unterscheiden

und die systemische Reaktion auf die entsprechende Art des Angriffes abzustimmen (Heil und Ton, 2008; Koo und Howe, 2009).

1.4 Die Zielsetzung der Arbeit

Im Garten- und Zierpflanzenbau wird die Regenerationsfähigkeit bestimmter Pflanzen genutzt, um diese über die Bewurzelung von Stecklingen vegetativ zu vermehren. Für die vegetative Vermehrung werden die für die Bewurzelung vorgesehenen Seitentriebe von der Mutterpflanze abgetrennt. Dadurch kommt es zur Verwundung der Pflanze. Die aus der Verwundung resultierende pflanzliche Reaktion hat die Heilung des geschädigten Gewebes und die Aktivierung von Abwehrmechanismen zur Folge, wobei Letzteres dem Schutz der Pflanze dient.

In der durch Verwundung ausgelösten pflanzlichen Reaktion kommt der JA bzw. den von ihr abgeleiteten Verbindungen eine wesentliche Rolle zu. Infolge eines Verwundungsreizes akkumulieren Jasmonate sowohl im verwundeten als auch im unverwundeten Gewebe transient und sind in der Lage, ein breites Spektrum an Abwehrmechanismen zu induzieren. Inwiefern die durch die Verwundung induzierte Jasmonat-Akkumulation auch nachgelagerte Entwicklungsprozesse der Pflanze beeinflusst, ist nicht bekannt. Da Jasmonate unter anderem an der Regulation einer Vielzahl von pflanzlichen Entwicklungsprozessen beteiligt sind, ist im Hinblick auf die Regeneration von Adventivwurzeln eine Einflussnahme der Jasmonate nicht ausgeschlossen. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellung beantwortet werden:

Wie wirkt sich das vollständige Abtrennen der zu bewurzelnden Stecklinge von der Mutterpflanze auf die Synthese der Jasmonate aus und beeinflussen diesbezügliche Änderungen die nachfolgende Regeneration von Adventivwurzeln?

So sollten mögliche die Jasmonat-Biosynthese betreffende Änderungen während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen aufgedeckt werden. Aber auch die Gehalte anderer für die Regeneration der Adventivwurzeln wichtiger Phytohormone waren von Interesse.

Änderungen in den endogenen Jasmonat-Gehalten würden jedoch noch keine Rückschlüsse auf mögliche Funktionen zulassen, weshalb zwei zusätzliche funktionelle Ansätze gewählt wurden. Zum einen sollten pharmakologische Experimente durchgeführt werden. Diese hatten das Ziel, eine mögliche Wirkung exogen verabreichter Jasmonate auf die Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen nachzuweisen und mögliche Interaktionen zu anderen Phytohormonen aufzuzeigen.

Andererseits sollte untersucht werden, ob die Regeneration von Adventivwurzeln infolge einer modulierten Jasmonat-Biosynthese beeinflusst wird. Hierfür sollten die Jasmonat-Gehalte in *Petunia* über die AOC mit Hilfe von *AOC-sense*-Pflanzen erhöht bzw. mit Hilfe von *PhAOC*-Insertionsmutanten und *PhAOC-RNAi*-Pflanzen reduziert werden. Sollten die Stecklinge der so generierten Pflanzen Änderungen in der Regeneration von Adventivwurzeln aufweisen, könnte dies auf eine regulierende Funktion der Jasmonate hinweisen. Dieser Aspekt müsste dann im Zusammenhang mit den anderen an der Wurzelregeneration beteiligten Wachstumsregulatoren betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Wildtyp (WT): *Petunia hybrid cv. W115*

Transgene Pflanzen: *PhAOC-sense, MtAOC1-sense, PhAOC-RNAi, pMDC, pHell* (siehe 2.7)

dTph1-Insertionsmutanten: *Petunia hybrida cv. W138* (Koes et al., 1995)

2.1.2 Bakterienstämme

In Tabelle 2-1 sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgelistet.

Tabelle 2-1: Bakterienstämme, die zu Klonierungs- bzw. Expressionsarbeiten eingesetzt wurden.

Stamm	Genotyp	Verwendung
<i>Escherichia coli</i> XL1blue (Stratagene)	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacI_qZΔM15 Tn 10(Tet^r)]</i>	Allgemeine Klonierungsarbeiten
<i>Escherichia coli</i> DH5α (Clontech)	F ⁻ , <i>deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(r_k⁻m_k⁺), recA1, relA1, supE44, Φ80lacZΔM15, thi-1, Δ(lacZYA-argFV169)</i>	Allgemeine Klonierungsarbeiten
<i>Escherichia coli</i> BL21-Codon Plus(D3)-RIL (Stratagene)	B F ⁻ , <i>ompT, hsdS(r_B⁻m_B⁻), dcm⁺, Tet^r, galλ(DE3), endA, Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>	Heterologe Expression der PhAOC
<i>Escherichia coli</i> One Shot [®] TOP10 (Invitrogen)	F ⁻ , <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara leu)7697, galJ, galK, rpsL (Str^r), endA1, nupGλ</i>	Gateway-System zur Erhaltung von Plasmiden
<i>Escherichia coli</i> One Shot [®] ccdB Survival [™] T1 ^r (Invitrogen)	F ⁻ , <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara leu)7697, galJ, galK, rpsL (Str^r), endA1, nupG fhuA::IS2</i>	Gateway-System zur Erhaltung von Plasmiden mit ccdB Gen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 (Koncz und Schell, 1986)	pMP90RK (pTiBo542ΔT-DNA), Rif ^r , Gent ^r	Transformation von <i>Petunia hybrida</i>

2.1.3 Vektoren

In Tabelle 2-2 sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren aufgelistet.

Tabelle 2-2: Vektoren, die zu Klonierungs- bzw. Expressionsarbeiten eingesetzt wurden.

Bezeichnung	Größe [kb]	Resistenzgen	Verwendung	Besonderheiten
pGEM [®] -T Easy (Promega)	3,0	Amp ^r	T/A-Klonierung von PCR-Produkten	3'-T-Überhänge, <i>lacZ</i> -Gen
pET28a (+) (Novagen)	5,4	Kan ^r	Heterologe Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	6xHis N- und C-terminal
pENTR [™] /D TOPO (Invitrogen)	2,6	<i>ccdB</i> -Gen Kan ^r	Gerichtete Klonierung von <i>blunt-end</i> PCR-Produkten im <i>Gateway</i> -System	<i>attL1</i> - und <i>attL2</i> -Sequenzen, Topoisomerase I mit zusätzlicher Ligase-Aktivität
pMDC 32 (Curtis und Grossniklaus, 2003)	11,8	Hyg ^r Kan ^r	Binärer Vektor im <i>Gateway</i> -System	<i>attR1</i> und <i>attR2</i> -Sequenzen, Klonierung beruht auf Rekombination des λ -Phagen
pHellsgate 8 ¹	17,5	Spe ^r Kan ^r	Binärer Vektor im <i>Gateway</i> -System	<i>attR1</i> und <i>attR2</i> -Sequenzen, Klonierung beruht auf Rekombination des λ -Phagen

2.1.4 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien und molekularbiologischen Reagenzien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den folgenden Firmen bezogen:

Farbstoffe: Roth, Serva, Merck, BioRad, Sigma-Aldrich

Laborchemikalien und Lösungsmittel: Roth, Sigma-Aldrich, Roche, Merck

Enzyme: Fermentas, Promega, Invitrogen, Qiagen

Nährmedien, Antibiotika und Phytohormone: Sigma-Aldrich, Duchefa, Merck, Roth

2.1.5 Oligonukleotide

Alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind unter Punkt 6.1 aufgelistet und wurden von der Firma Eurofins MWG/Operon bezogen. Die Ableitung der Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe der *Clone Manager Professional Suite*-Software (Sci Ed Software). Die Oligonukleotide für die Anwendung in der qRT-PCR wurden mit Hilfe der *PrimerExpress[™]*-Software (Applied Biosystems) abgeleitet.

¹ http://www.pi.csiro.au/tech_licensing_biol/MapsProtocol.htm

2.2 Die Anzucht und Transformation von Bakterien

2.2.1 Die Anzucht von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf Agarplatte oder als Suspensionsschüttelkultur (200 rpm) in Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook und Russell, 2001; A2.2) bei 37 °C (*Escherichia coli*) bzw. 28 °C (*Agrobacterium tumefaciens*). Durch den Zusatz von Antibiotikum in der entsprechenden Endkonzentration [Ampicillin (50 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Gentamicin (25 µg/ml) und Rifampicin (50 µg/ml)] erfolgte die Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide.

2.2.2 Die Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Vorbereitung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen der Stämme XL1blue und DH5α und die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte nach der CaCl₂-Methode (Sambrook und Russell, 2001; 1.116-1.118). Die *Escherichia coli* Stämme *BL21-Codon Plus(D3)-RIL*, *One Shot TOP10* sowie *One Shot ccdB Survival* wurden nach den Angaben des Herstellers transformiert.

2.2.3 Die Herstellung und Transformation kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Die Vorbereitung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen (Stamm GV3101) und die Transformation der kompetenten Zellen mittels Elektroporation erfolgte nach der Methode von Sambrook und Russell (2001, 1.119-1.122).

2.3 Die Anzucht, Kultivierung und Transformation von Pflanzen

2.3.1 Die Anzucht und Kultivierung von Pflanzenmaterial

Für die Anzucht von Pflanzen wurden die entsprechenden Samen zunächst oberflächensterilisiert. Hierfür erfolgte die Inkubation der Samen für zwei Minuten in 70 % (v/v) Ethanol und für zehn Minuten in 10 % (v/v) Natriumhypochlorit mit 0,1 % (w/v) SDS. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Samen auf ½ Murashige und Skoog (MS)-Medium [pH 5,8; 2,15 g/l MS (*salt base*); 0,5 g/l MES; 0,1 g/l Myo-Inositol; 0,01 g/l Thiamin; 0,01 g/l Nikotinsäureamid; 0,01 g/l Pyridoxin; 10 g/l Saccharose; 9 g/l Pflanzen-Agar] ausgelegt und bei 22 °C unter Langtagbedingungen (14 Stunden Licht pro Tag) zum Keimen gebracht.

Die für die pharmakologischen Experimente (siehe 2.4) bzw. die für die Transformation (siehe 2.3.3) benötigten Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen bei 22 °C unter Langtagbedingungen weiter kultiviert.

Alle anderen Pflanzen wurden nach sechs bis acht Wochen auf Erde (ED 73 + Optifer; Patzer) vereinzelt und bei 22 °C und einer Luftfeuchte von 60 % unter Kurztagbedingungen (zehn Stunden Licht pro Tag) kultiviert. Entsprechend ihres Wachstums erfolgte die Umsetzung der Pflanzen in größere Töpfe. Nach Erreichen des maximal verwendeten Topfdurchmessers von 17 cm wurden die Pflanzen einmal wöchentlich mit 50 ml 1 % (w/v) Hakaphos spezial (Kammlott) gedüngt.

Zur Samengewinnung erfolgte die Kultivierung der Pflanzen unter Gewächshausbedingungen (Tageslicht mit Zusatzbeleuchtung bei 24 °C und 65 % Luftfeuchte). Nach der Ausbildung von Blüten wurden die Pflanzen geselbstet und nach vier bis sechs Wochen wurden die reifen Samenkapseln geerntet.

2.3.2 Die Ernte und Bewurzelung von Stecklingen

Von mindestens drei Monate alten Pflanzen wurden alle ein bis zwei Wochen 8 bis 10 cm lange Seitentriebe geerntet. Diese Stecklinge wurden in mit feuchtem Perlit (Kammlott) gefüllten Mini-gewächshäusern (56 x 38 cm) bei 22 °C und einer Lichtintensität von $6 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ unter Kurztagbedingungen bewurzelt. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden entweder die Anzahl der Primordien (siehe 2.10.3), die Anzahl der Wurzeln sowie die durchschnittliche Wurzellänge pro Steckling ermittelt oder es wurde Probenmaterial für nachfolgende Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

2.3.3 Die Transformation von *Petunia hybrida*

Die Vorbereitung des Pflanzenmaterials

Die Anzucht von sterilen Pflanzen erfolgte wie unter Punkt 2.3.1 beschrieben. Nach zwei Wochen wurden die Keimlinge vereinzelt und für weitere drei Wochen auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium belassen. Die anschließende Vermehrung der Pflanzen erfolgte vegetativ. Hierfür wurden aller zwei Wochen die Spross-Spitzen der sterilen Pflanzen entfernt und zum Bewurzeln auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium transferiert. Die verbleibenden Blätter der Pflanzen wurden in 1 cm^2 große Stücke geschnitten und mit der Blattoberseite auf mit Vorkulturmedium [pH 5,7; 4,3 g/l MS (*salt base*); 30 g/l Saccharose; 1 ml/l Gamborg Vitaminlösung] befeuchtetes Filterpapier gelegt. Die Vorinkubation der Blattstücke erfolgte bei 22 °C und einer Lichtintensität von $6 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ unter Langtagbedingungen für zwei Tage.

Die Vorbereitung der Bakterienkultur

Nach der Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (siehe 2.2.3) mit den entsprechenden binären Vektoren bzw. Kontroll-Plasmiden (siehe 2.7) wurden die Zellen in LB-Medium vermehrt (siehe 2.2.1). Die Bakterienkultur wurde nach dem Entfernen des LB-Mediums (Zentrifugieren für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 4000 rpm) durch Zugabe von Vorkulturmedium auf eine optische Dichte von 0,4 bis 0,5 eingestellt.

Die Co-Kultivierung der Blattstücke mit der Bakterienkultur

Die vorbereiteten Blattstücke wurden für zehn Minuten in der Bakteriensuspension geschwenkt und nach dem Entfernen der Bakteriensuspension bei 24 °C und einer Lichtintensität von $6 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ unter Langtagbedingungen für drei Tage inkubiert.

Die Selektion und Regeneration

Zunächst wurden die Blattstücke dreimal für je 15 Minuten mit Waschlösung [pH 5,8; 1,1 g/l MS (*salt base*); 1 g/l Ticarcillin] behandelt, um den Großteil der Bakterien zu entfernen. Die getrockneten Blattstücke wurden nachfolgend mit der Blattoberseite auf Selektionsmedium [pH 5,7; 4,3 g/l MS (*salt base*); 1 ml/l Gamborg Vitaminlösung; 1 mg/l BAP; 10 µg/l NAA; 1 g/l Ticarcillin; 30 g/l Saccharose; 9 g/l Pflanzen-Agar; 100 µg/ml Kanamycin bzw. 10 µg/ml Hygromycin] transferiert. Alle drei bis vier Wochen erfolgte das Umsetzen der Blattstücke auf frisches Selektionsmedium. Nach ungefähr 14 Tagen bildeten sich erste Kalli an den Außenseiten der Blattstücke, aus denen sich nach weiteren drei Wochen Sprosse regenerierten. Die Sprosse wurden von den Kalli abgetrennt und auf ½ MS-Medium überführt. Die Bewurzelung setzte nach ungefähr drei Wochen ein. Die regenerierten Pflanzen wurden in Erde getopft und wie unter Punkt 2.3.1 beschrieben kultiviert.

2.4 Pharmakologische Experimente

Für die pharmakologischen Experimente erfolgte die Anzucht von Pflanzen unter sterilen Bedingungen (siehe 2.3.1). Nach zwei Wochen wurden die Wurzeln der Pflanzen entfernt und es erfolgte der Transfer der Stecklinge auf ½ MS-Platten. Dem ½ MS-Medium wurden zuvor die zu applizierenden Substanzen (siehe Tabelle 2-3) in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben. Dabei wurde eine Lösungsmittel-Endkonzentration von 0,1 % im Medium nicht überschritten. Die Bewurzelung der Stecklinge erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 22 °C unter Langtagbedingungen. Nach zwei Wochen wurden die Stecklinge fotografiert und sowohl die durchschnittliche Wurzellänge als auch die Wurzelanzahl pro Steckling mit Hilfe der *Axiovision 4.5*-Software (Carl Zeiss) bestimmt.

Tabelle 2-3: Übersicht der für die pharmakologischen Experimente verwendeten Substanzen.

Substanzklasse	Verwendete Substanzen
Jasmonate	JA, OPDA, JA-Ile, 12-OH-JA
Auxine	2,4-D, IBA, IAA
Ethylen-freisetzende Substanzen	ACC, Ethephon
Inhibitoren des Auxin-Transports bzw. der Auxin-Wirkung	NPA, TIBA, PCIB
Inhibitoren der Ethylen-Biosynthese bzw. der Ethylen-Wirkung	AVG, STS

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Die Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

2.5.1.1 Die Isolierung von DNA

Die Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach der modifizierten Methode Hill-Ambroz *et al.* (2002). Hierfür wurden 20 mg Blattmaterial in 40 µl 0,25 M Natriumhydroxid mechanisch zerkleinert und für eine Minute auf 95 °C erhitzt. Nach Zugabe von 130 µl 0,1 M Tris (pH 8,0) wurde der Ansatz bei 14000 rpm zehn Minuten zentrifugiert. Dem Überstand wurden 15 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 120 µl Isopropanol zugesetzt, um die genomische DNA zu fällen. Die Fällung erfolgt bei -80 °C für eine Stunde. Nach dem Zentrifugieren des Ansatzes bei 4 °C und 5000 rpm für 40 Minuten wurde die präzipitierte DNA mit 200 µl eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das Lösen der genomischen DNA erfolgte mittels TE-Puffer (pH 8,0; 10 mM Tris; 1 mM EDTA).

Für die Isolierung größerer Mengen genomischer DNA für die Southern Blot-Analyse (siehe 2.5.2.9) wurde das *Qiaprep Spin Maxiprep*-Kit (Qiagen) verwendet. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration der isolierten DNA wurde absorptions-photometrisch bestimmt (siehe 2.5.2.1). Die Überprüfung der DNA-Integrität erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.5.2.2).

Die Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* bzw. *Agrobacterium tumefaciens* fand das *Qiaprep Spin Miniprep*-Kit (Qiagen) Verwendung. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.5.1.2 Die Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini-Kits* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration der isolierten RNA wurde absorptions-photometrisch bestimmt (siehe 2.5.2.1). Weiterhin erfolgte die Überprüfung der RNA-Integrität mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.5.2.2). Hierfür wurden 0,5 µg der Gesamt-RNA im Agarosegel unter nativen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

2.5.1.3 Die Reinigung von DNA

Die Reinigung von mittels PCR amplifizierter DNA erfolgte mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification-Kits* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

Die für die Southern Blot-Analyse (siehe 2.5.2.9) verwendete DNA wurde mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, wobei die Extraktion und die anschließende Ethanol-Fällung der DNA nach Sambrook und Russell (2001, 8.25-8.26) erfolgte.

2.5.1.4 Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA (siehe 2.5.2.2) wurden die entsprechenden Fragmente aus dem Agarosegel geschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction-Kits* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aus der Gelmatrix eluiert.

2.5.2 Die Modifizierung und Analyse von Nukleinsäuren

2.5.2.1 Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm absorptionsphotometrisch bestimmt (RNA/DNA Calculator Gene Quant, Biochrom). Die Reinheit der entsprechenden Nukleinsäuren wurde anhand des Verhältnisses A_{260}/A_{280} ermittelt.

2.5.2.2 Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Für die elektrophoretische Auftrennung von RNA bzw. DNA kamen, sofern nicht anders angegeben, 1 %ige (w/v) Agarosegele in 1x TBE (pH 8,0; 0,05 M Tris; 1 mM EDTA; 0,04 M Borsäure) zur Anwendung, denen zur Visualisierung der Nukleinsäuren 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben wurde. Als Größenstandard fand je nach erwarteter Fragment-Größe der *O'GeneRuler50 bp DNA Ladder* (Fermentas) oder der *Hyper Ladder I* (Bioline) Verwendung. Die RNA bzw. DNA wurde vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit Probenpuffer [20 % (v/v) Glycerin; 0,1 M EDTA; 1 % (w/v) SDS; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF] versetzt.

2.5.2.3 Die Ligation

Für die T/A-Klonierung von PCR-Produkten wurde das *pGEM-TEasy Vektor-System* (Promega) verwendet. Die Ligation in den Vektor erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Für die heterologe Expression der PhAOC in *Escherichia coli* fand das Vektor-System pET28a(+) Verwendung (siehe 2.8.2). Die Ligation wurde mit der im *pGEM-TEasy Vektor-System* enthaltenen T4 Ligase durchgeführt. Ein Ligationsansatz enthielt in einem Endvolumen von 10 µl 5 U T4 Ligase, 600 ng linearisierten Vektor und die dreifache molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragments. Die Ligation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

2.5.2.4 Die enzymatische Spaltung von DNA

Für die Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA wurden 0,2 – 0,5 µg DNA und 5 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt. Die enzymatische Spaltung erfolgte bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Arbeitstemperatur des Enzyms für eine Stunde. Anschließend wurden die entstandenen DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.2.2). Für präparative Ansätze (siehe 2.8.2) kamen 2 – 5 µg Plasmid-DNA und 50 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease zur Anwendung.

Für die enzymatische Spaltung der mittels Southern Blot-Analyse (siehe 2.5.2.9) zu analysierenden genomischen DNA wurden 5 – 10 µg DNA und 40 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 100 µl eingesetzt. Die enzymatische Spaltung erfolgte über Nacht.

2.5.2.5 Das Auffüllen von 5' Überhängen

Für das Auffüllen von durch enzymatische Spaltung entstandenen 5' Überhängen wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Fermentas) verwendet. Die Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.5.2.6 Die Markierung von DNA-Fragmenten

Für die unter 2.5.2.9 beschriebene Southern Blot-Analyse wurden Digoxigenin-markierte Sonden eingesetzt. Die Herstellung dieser Sonden erfolgte mit Hilfe des *PCR DIG Probe Synthesis*-Kit (Roche) nach den Angaben des Herstellers, wobei für die PCR 10 pg Plasmid-DNA (siehe 2.7) als Matrize und die im Anhang, Tabelle 6-5 aufgeführten Oligonukleotide verwendet wurden.

Für das *Screening* von Insertionsmutanten (siehe 2.6) kamen radioaktiv-markierte Sonden zur Anwendung. Für die Herstellung dieser Sonden wurden zwei DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert (siehe 2.5.2.7), wobei als Matrize genomische DNA (*Petunia hybrida* cv. W138) und die Oligonukleotide screenAOC-rev und AOCsense-for (Fragment I) sowie screenAOC-for und AOCsense-rev (Fragment II) verwendet wurden. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang Tabelle 6-5 angegeben. Nach der Reinigung der amplifizierten DNA (siehe 2.5.1.3) erfolgte die Synthese der radioaktiv-markierten Sonde mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I (Roche). Hierfür wurden 50 ng DNA-Fragment I und 50 ng DNA-Fragment II vereinigt und bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert. Nachfolgend wurden dem Ansatz 2 U Klenow-Fragment, 2 µl ³²P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml; Perkin Elmer) sowie 21 µl GAT-Mix [1,33 mg/ml acetyliertes Rinderserumalbumin (BSA); 43,2 ng/µl *random* Oligonukleotide; 33 mM β-Mercaptoethanol, je 0,5 mM dGTP, dATP und dTTP in HTM-Puffer (pH 6,8; 0,67 M HEPES; 0,17 M Tris; 17 mM Magnesiumchlorid)] zugefügt. Die Markierung erfolgte bei 25 °C für zwei Stunden.

Sowohl die Digoxigenin-markierten als auch die radioaktiv-markierten Sonden wurden vor der Zugabe zum Hybridisierungsansatz für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

2.5.2.7 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der PCR im *MasterCycler Gradient-Thermocycler* (Eppendorf). Für einen Standardansatz in einem Endvolumen von 50 µl wurden 0,1 - 50 ng DNA als Matrize mit jeweils 0,2 pmol der spezifischen Oligonukleotide im entsprechenden Reaktionspuffer eingesetzt. Für analytische Zwecke fand die *GoTaq DNA-Polymerase* (Promega) Verwendung. Ein typischer zeitlicher Ablauf einer PCR ist in Tabelle 2-4 angegeben.

Tabelle 2-4: Typischer zeitlicher Ablauf einer PCR. Die *Annealing*-Temperatur (Schritt 3) liegt 3 – 4 °C unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide.

Schritt	Dauer	Temperatur
1 Initiale Denaturierung	2 Minuten	94 °C
2 Denaturierung	30 Sekunden	94 °C
3 <i>Annealing</i>	30 Sekunden	<i>Annealing</i> -Temperatur der Oligonukleotide
4 Elongation → 36 Zyklen der Schritte 2 bis 4	1 Minute/ kbp	72 °C
5 Finale Elongation	10 Minuten	72 °C

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit möglichst geringer Fehlerrate (siehe 2.7 sowie 2.8) wurden für die T/A-Klonierung die *HotStar Taq DNA-Polymerase* (Qiagen) und für die *blunt-end* Klonierung die *ProofStart DNA-Polymerase* (Qiagen) verwendet. Die PCR erfolgte für beide Enzyme entsprechend den Herstellerangaben.

2.5.2.8 Die quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)

Die DNase Behandlung von RNA

Die isolierte Gesamt-RNA (siehe 2.5.1.2) wurde mit rekombinanter *DNase I* (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben behandelt, um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen. Der Erfolg der DNase Behandlung wurde mittels PCR überprüft (siehe 2.5.2.7), wobei die Oligonukleotide EF1 α -for und EF1 α -rev (Anhang, Tabelle 6-6) sowie 30 ng behandelte RNA als Matrize eingesetzt wurden.

Die Synthese der Erststrang cDNA

Die Synthese der Erststrang cDNA erfolgte mittels einer *Reverse Transkriptase (M-MLVRT RNase H Minus, Point Mutant, Promega)* nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde 1 μ g DNase-behandelte Gesamt-RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l unter Nutzung des Oligonukleotids Oligo (dT)₁₉ (Anhang, Tabelle 6-1) transkribiert. Vor der Analyse der synthetisierten cDNA wurde diese auf eine Konzentration von 5 ng/ μ l RNA-Äquivalent verdünnt.

Die Real-Time PCR

Die Real-Time PCR erfolgte mit Hilfe des *Mx3000PTM*-Systems (Stratagene) unter Nutzung des Nukleinsäure-bindenden Fluoreszenz-Farbstoffes SYBR Green. Für einen PCR-Ansatz in einem Endvolumen von 10 μ l wurden 15 ng cDNA als Matrize mit jeweils 0,2 pmol der Sequenzspezifischen Oligonukleotide (Anhang, Tabelle 6-6 bzw. Tabelle 6-7) und 5 μ l *SYBR Green PCR-*

MasterMix (Applied Biosystems) eingesetzt. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 2-5 aufgeführt.

Tabelle 2-5: Reaktionsablauf der Real-Time PCR.

Schritt	Dauer	Temperatur
1 Initiale Denaturierung	10 Minuten	95 °C
2 Denaturierung	30 Sekunden	95 °C
3 <i>Annealing</i>	60 Sekunden	60 °C
4 Elongation	30 Sekunden	72 °C
→ 40 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
5 Dissoziation	60 Sekunden	95 °C
	30 Sekunden	60 °C
	30 Sekunden	95 °C

Die Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der *MxPro QPCR*-Software (Stratagene), wobei die Ct-Werte (*Cycle Threshold*; Schwellenwert-Zyklus) auf der Basis der Hintergrund-Fluoreszenz ermittelt wurden. Die Berechnung der relativen Transkript-Menge erfolgte nach der ΔCt -Methode. Hierfür war es zunächst erforderlich, den Ct-Wert des zu untersuchenden Gens (Gen Y) mit dem Ct-Wert des konstitutiv exprimierten Kontroll-Gens (Gen X) nach der Formel $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{GenX}} - \text{Ct}_{\text{GenY}}$ zu normieren. Mit Hilfe der so erhaltenen ΔCt -Werte konnte der *comparative expression level* (CEL) nach der Formel $\text{CEL} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$ berechnet werden. Die relative Transkript-Menge eines Gens entsprach dem berechneten Mittelwert dreier technischer Replikate.

2.5.2.9 Der spezifische Nachweis von Nukleinsäuren (Southern Blot-Analyse)

Die Vorbereitung der DNA

Zunächst wurde die genomische DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen enzymatisch gespalten (siehe 2.5.2.4) und die Restriktionsendonukleasen wurden nachfolgend mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aus dem Ansatz entfernt (siehe 2.5.1.3). Nach Fällung der gespaltenen DNA wurde diese in 20 μl dest. Wasser aufgenommen und nach Zugabe von Probenpuffer in einem 0,75 %igem Agroseigel in 1x TAE-Puffer (pH 8,0; 0,04 M Tris-Acetat; 1 mM EDTA) bei 20 V über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.2.2). Als Größenstandard wurde der *DNA-Molecular Weight Marker II Dig-labelled 0,12–23,1 kbp* (Roche) verwendet.

Der Transfer der Nukleinsäuren

Vor dem eigentlichen Nukleinsäure-Transfer vom Gel auf eine Nylon-Membran war es erforderlich, das Agarosegel wie folgt vorzubehandeln:

- Depurinierung der DNA für zehn Minuten in 0,25 M Salzsäure
- Denaturierung der DNA für 30 Minuten in Denaturierungslösung (0,5 M Natriumhydroxid; 1,5 M Natriumchlorid)
- Neutralisierung des Gels für 30 Minuten in Neutralisierungslösung (pH 7,5; 1 M Tris, 2 M Natriumchlorid)
- Äquilibrieren des Gels in 20x SSC (pH 7,0; 3 M Natriumchlorid; 0,3 M Natriumcitrat).

Der Transfer der Nukleinsäuren auf die Nylon-Membran (Hybond NX, Amersham Biosciences) erfolgte nach der Kapillar-Blot-Methode (Sambrook und Russell, 2001; 6.44-6.45). Mittels UV-*crosslinking* (eine Minute bei $1200 \times 10 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) wurde die transferierte DNA auf der Membran fixiert.

Die Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter Sonde

Durch die Verwendung von markierten Sonden können auf Membranen fixierte DNA-Fragmente spezifisch nachgewiesen werden. Hierfür wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre überführt und mit *DIG Easy Hyb*-Puffer (Roche) bei 42 °C für zwei Stunden vorbehandelt. Die Digoxigenin-markierte Sonden wurden, wie unter Punkt 2.5.2.6 beschrieben, hergestellt. Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde (5 - 25 ng Sonde/ml *DIG Easy Hyb*-Puffer) erfolgte bei 42 °C über Nacht.

Der Nachweis von Digoxigenin-markierten Nukleinsäuren

Der spezifische Nachweis von Digoxigenin-markierten Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe des *DIG Luminescent Detection*-Kit (Roche). Nach dem Hybridisieren war es zunächst erforderlich, die Membran zweimal fünf Minuten mit 0,1% (w/v) SDS in 2x SSC bei Raumtemperatur und zweimal 15 Minuten mit 0,1% (w/v) SDS in 0,5x SSC bei 68 °C zu waschen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde für eine Minute in Wasch-Puffer [pH 7,5; 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M Natriumchlorid; 0,3 % (v/v) Tween 20] äquilibriert und dann für zwei Stunden mit 2x Blockierungslösung [2 % (w/v) *blocking reagent* in Maleinsäure-Puffer (pH 7,5; 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M Natriumchlorid)] inkubiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation der Membran mit der FAB-Antikörperlösung (2x Blockierungslösung; 1,5 U/ml Anti-Digoxigenin-AP, *Fab fragment*) erfolgte die Behandlung der Membran mit Wasch-Puffer (zweimal 15 Minuten). Anschließend wurde die Membran für fünf Minuten in DIG-Detektionspuffer (pH 9,5; 0,1 M Tris; 0,1 M Natriumchlorid) äquilibriert und für fünf Minuten in CSPD-Lösung [250 nM CSPD (Roche) in DIG-Detektionspuffer] inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte durch Exposition eines Röntgen-Films (*Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film*; Roche) mit der Membran unter Lichtausschluss (37 °C für zwei Stunden).

2.5.2.10 Die Sequenzierung von DNA und die Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma Eurofins MWG/Operon. Für die Analyse der erhaltenen Sequenzen wurde die *Clone Manager Professional Suite*-Software verwendet. Datenbankabfragen erfolgten mit den Standardeinstellungen des *BLAST*-Programms über die Internetseiten <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> bzw. http://blast.jcvi.org/euk-blast/plantha_blast.cgi.

2.6 Das Screening einer Population von *dTph1*-Insertionsmutanten

Das *Screening* einer Population von *dTph1*-Insertionsmutanten auf mögliche Insertionen im *PhAOC* Gen erfolgte nach der Methode Koes *et al.* (1995). Die Analyse von aus Blattmaterial isolierter genomischer DNA erfolgte mittels PCR (siehe 2.5.2.7) unter Nutzung des Transposon-spezifischen Oligonukleotids OUT1 sowie der Gen-spezifischen Oligonukleotide AOC-for bzw. AOC-rev (Anhang, Tabelle 6-8). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden im 1 %igen Agarose-Gel in 0,5 x TAE elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.2.2). Als Marker kam der *250-4000bp ladder* (MRC Holland) zur Anwendung. Nach dem Denaturieren der DNA (Inkubation zweimal 15 Minuten in 0,4 M Natriumhydroxid) erfolgte der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylon-Membran (*Blotting Nylon-Membran TypB*; Fluka) wie unter Punkt 2.5.2.9 beschrieben. Anschließend wurde die Membran neutralisiert (pH 7,5; 1 M Tris in 5x SSC) und in eine Hybridisierungsröhre überführt. Die Vorhybridisierung erfolgte in Hybridisierungspuffer [pH 7,2; 7 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 500 mM Natriumphosphatpuffer] bei 65 °C für zwei Stunden. Für den spezifischen Nachweis der Nukleinsäuren war es erforderlich, die auf der Membran fixierte DNA mit einer markierten DNA-Sonde zu behandeln. Die radioaktiv-markierte Sonde wurde wie unter Punkt 2.5.2.6 beschrieben, hergestellt. Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgte bei 65 °C über Nacht. Anschließend wurde die Membran mit 0,1 % (w/v) SDS in 2 x SSC bei 65 °C für dreimal 15 Minuten gewaschen. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

2.7 Die Generierung transgener *AOC-sense*- bzw. *AOC-RNAi*-Pflanzen

Für die Generierung der *35S::AOC-sense*- bzw. *35S::AOC-RNAi*-Pflanzen wurde die auf der Sequenz-spezifischen Rekombination des Bakteriophagen λ beruhende *Gateway*-Technologie genutzt. Zunächst erfolgte die gerichtete Subklonierung der entsprechenden DNA-Fragmente in den *Gateway-entry*-Vektor mit Hilfe des *pENTR Directional TOPO Cloning-Kits* (Invitrogene). Dabei war es erforderlich mittels PCR *blunt end* PCR-Fragmente mit einem CACC-Überhang am 5'-Ende zu amplifizieren. Über die im *entry*-Vektor enthaltenen *attL1* und *attL2* Erkennungssequenzen erfolgte dann die LR-Rekombinationsreaktion mit dem entsprechenden *Gateway-destination*-Vektor.

Die Erzeugung der 35S::AOC-sense-Vektoren

Der kodierende Teil der *PhAOC* bzw. der *MtAOC1* wurde mittels PCR amplifiziert (siehe 2.5.2.7), wobei die *Proofstart DNA-Polymerase* und die Oligonukleotide *PhAOC1-for* und *PhAOC859-rev* bzw. *MtAOC-for* und *MtAOC-rev* Verwendung fanden (Anhang, Tabelle 6-3). Die gereinigten DNA-Fragmente (siehe 2.5.1.3) wurden nach den Angaben des Herstellers in den *pENTR/SD/D-TOPO*-Vektor (*entry*-Vektor) subkloniert und in *One Shot TOP10*-Zellen transformiert (siehe 2.2.2 und 2.2.1). Nach Überprüfung der Plasmid-DNA mittels Sequenzierung (siehe 2.5.2.10) schloss sich die LR-Rekombinationsreaktion in den binären Vektor *pMDC 32* (*destination*-Vektor) an. Hierfür wurde der *LR Clonase II enzyme-Mix* (Invitrogene) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Nach der Transformation in den *Escherichia coli*-Stamm DH5 α wurde der Erfolg der Klonierung mittels Restriktionsanalyse (siehe 2.5.2.4) überprüft.

Die Erzeugung des 35S::AOC-RNAi-Vektors

Die Erzeugung des *35S::AOC-RNAi*-Vektors verlief analog zu der der *35S::AOC-sense*-Vektoren, wobei für die Amplifizierung eines 180 bp großen Fragments der *PhAOC* die Oligonukleotide *AOCRNAi-for* und *AOCRNAi-rev* Verwendung fanden (Anhang, Tabelle 6-3). Die Klonierung der amplifizierten DNA-Sequenz in den binären Vektor *pHellsgate 8* (*destination*-Vektor) erfolgt in *sense* und *antisense*-Orientierung.

Die Erzeugung der Kontroll-Plasmide

Für die Erzeugung der Kontroll-Plasmide *LVpMDC* bzw. *LVpHell* wurde der Vektor *pMDC 32* mittels *XbaI* sowie *XhoI* und der Vektor *pHellsgate 8* mittels *XbaI* enzymatisch gespalten (siehe 2.5.2.4). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA (siehe 2.5.2.2) wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel eluiert (siehe 2.5.1.4) und die durch die enzymatische Spaltung entstandenen 5'-Überhänge aufgefüllt (siehe 2.5.2.5). Anschließend erfolgte die Rezirkulierung der gereinigten Plasmid-DNA mit Hilfe der T4 Ligase (siehe 2.5.2.3) und die Transformation in DH5 α -Zellen (siehe 2.2.1 und 2.2.2). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft (siehe 2.5.2.4).

Die Generierung und Selektion transgener Pflanzen

Nach der Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mit den entsprechenden binären Vektoren bzw. Kontroll-Plasmiden (siehe 2.2.3) wurde *Petunia* nach der unter Punkt 2.3.3 beschriebenen Methode transformiert. Dabei erfolgte die Selektion der *AOC-sense*-Pflanzen und der mit dem *LVpMDC* transformierten Pflanzen mittels Hygromycin. Die *PhAOC-RNAi*-Pflanzen bzw. die mit dem *LVpHell* transformierten Pflanzen wurden auf Kanamycin selektiert. Vor dem Topfen in Erde wurden alle regenerierten Pflanzen auf das Vorhandensein der gewünschten Transfer (T)-DNA untersucht. Die Selektion der Pflanzen erfolgt mittels PCR (siehe 2.5.2.7), bei der aus Blattmaterial isolierte genomische DNA (siehe 2.5.1.1) als Matrize diente und die im Anhang, Tabelle 6-2 aufgelisteten T-DNA-spezifischen Oligonukleotide verwendet wurden.

2.8 Die Isolierung und Klonierung der *PhAOC* sowie deren heterologe Expression in *Escherichia coli*

2.8.1 Die Isolierung und Klonierung

Für die Isolierung der *PhAOC* cDNA wurde das *BD-SMART-RACE-cDNA-amplification*-Kit (BD Biosciences Clontech) entsprechend den Herstellerangaben genutzt. Alle verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang, Tabelle 6-1 aufgelistet. Nach der Isolierung von Gesamt-RNA (siehe 2.5.1.2) aus Blattmaterial von *Petunia* erfolgte zunächst die Synthese der Erststrang cDNA. Hierfür wurden 1 µg Gesamt-RNA sowie die Oligonukleotide 5'-RACE CDS und BD SMART II A in einem Endvolumen von 5 µl eingesetzt. Die Amplifizierung mittels PCR erfolgte mit der synthetisierten cDNA als Matrize sowie dem *RThomerase*- und dem degenerierten Oligonukleotid. Letzterer basierte auf einem Vergleich der bekannten AOC AS-Sequenzen von *Solanum lycopersicum* (AF384374), *Nicotiana tabacum* (AJ308487) und *Solanum tuberosum* (AY135641) und wurde von der konservierten Region FYFGDYG abgeleitet. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in das Vektorsystem *pGEM-TEasy* ligiert (siehe 2.5.2.3) und nach der Transformation in XL1blue-Zellen (siehe 2.2.2 und 2.2.1) erfolgte die Überprüfung der Plasmid-DNA mittels Sequenzierung (siehe 2.5.2.10). Das so isolierte DNA-Fragment repräsentierte das 3'-Ende der *PhAOC* cDNA. Um die vollständige cDNA-Sequenz zu erhalten, wurde von dem nun bekannten 3'-Ende der *PhAOC* das Gen-spezifische Oligonukleotid GSPI abgeleitet, welches neben dem Oligonukleotid UPM in der folgenden PCR Verwendung fand. Die vollständige Sequenz der *PhAOC* cDNA wurde nach einer weiteren Amplifizierung mittels PCR mit den Oligonukleotiden UPM und GSPIII erhalten.

2.8.2 Die heterologe Expression in *Escherichia coli*

Für die heterologe Expression der *PhAOC* in *Escherichia coli* kam das Vektor-System pET28a(+) zur Anwendung. Der kodierende Teil der *PhAOC* wurde ohne das putative Signalpeptid mittels PCR amplifiziert (siehe 2.5.2.7), wobei die Oligonukleotide *AOCEXNcoI-for* und *AOCEXXhoI-rev* bzw. *AOCEXNcoI-for* und *AOCEXXhoISTOP-rev* (Anhang, Tabelle 6-2) und die HotStarTaqDNA-Polymerase Verwendung fanden. Die amplifizierte DNA erhielt somit am 5'-Ende eine zusätzliche *NcoI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine Schnittstelle für *XhoI*. Das gereinigte DNA-Fragment (siehe 2.5.1.3) wurde in das Vektorsystem *pGEM-T Easy* ligiert (siehe 2.5.2.3) und nach Transformation in XL1blue-Zellen (siehe 2.2.2 und 2.2.1) erfolgte die Sequenzierung (siehe 2.5.2.10) der isolierten Plasmid-DNA (siehe 2.5.1.1). Das DNA-Fragment mit korrekter Sequenz wurde über die mittels PCR angefügten Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* in den linearisierten pET28a(+) Vektor ligiert (siehe 2.5.2.4 und 2.5.2.3). Anschließend erfolgte die Transformation in den Expressionsstamm BL21 (siehe 2.2.2).

Die transformierten BL21-Zellen wurden in 2 x 30 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin angezogen (siehe 2.2.1) und nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 erfolgte die Induktion der Expression mit 1 mM IPTG. Die Inkubation wurde unter den bereits genannten Bedingungen für weitere vier Stunden fortgesetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 4000 rpm

für 20 Minuten zentrifugiert. Die Gewinnung löslicher Proteinrohextrakte aus den pelletierten Zellen erfolgt wie unter Punkt 2.9.4 beschrieben.

2.9 Biochemische Methoden und Analytik

2.9.1 Die Gewinnung von Proteinrohextrakten aus Pflanzenmaterial

Für die Extraktion von Gesamt-Protein wurde Pflanzenmaterial unter flüssigen Stickstoff gemörsert und eingewogen. Jeweils 1 g der entsprechenden Probe wurde mit 5 ml Aceton versetzt und fünf Minuten bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nachfolgend getrocknet und in 3 ml Homogenisierungspuffer [pH 7,0; 50 mM Natriumphosphatpuffer; 0,05 % (v/v) Tween 20; 2 % (w/v) PVPP] aufgenommen. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4 °C unter Schütteln wurden die Proben bei 4 °C und 14000 rpm für 40 Minuten zentrifugiert und der die löslichen Proteine enthaltene Überstand wurde, wie unter 2.9.3 beschrieben, konzentriert.

2.9.2 Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach der Methode Bradford (1976) ermittelt. Hierfür wurde die entsprechende Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz [0,065 % (w/v) Coomassie G-250 in 5 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Phosphorsäure] versetzt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch ermittelt. Anhand einer für BSA aufgenommenen Eichkurve konnte die Protein-Konzentration berechnet werden.

2.9.3 Das Fällern und Konzentrieren von Proteinlösungen

Die zu fällende Proteinlösung wurde mit Trichloressigsäure (TCA) versetzt, sodass eine Endkonzentration von 10 % (v/v) TCA erreicht wurde. Die Fällung erfolgte bei 4 °C für zwei Stunden. Nach dem Zentrifugieren (4 °C, 13000 rpm, 15 Minuten) wurde das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, mittels Speed-Vac (Eppendorf) getrocknet und für die SDS-PAGE in 15 µl Probenpuffer aufgenommen (siehe 2.9.5).

Verdünnte Proteinlösungen wurden mit Hilfe einer *Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit* mit Ultracel-10-Membran (Millipore) bei 4 °C und 4000 rpm konzentriert.

2.9.4 Die Reinigung von His-Fusionsproteinen

Die Gewinnung löslicher Proteinrohextrakte aus *Escherichia coli*

Für die Gewinnung löslicher Proteinrohextrakte wurde die entsprechende Zellsuspension (siehe 2.8.2) bei 4 °C und 14000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert und das Pellet wurde in 1:40 Volumen (bezogen auf das Volumen der Originalkultur vor der Ernte) Extraktionspuffer [pH 7,0; 50 mM Kaliumphosphatpuffer; 150 mM Natriumchlorid; 10 % (v/v) Glycerin] aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µg/ml Lysozym (Roth) erfolgte die Inkubation der Zellsuspension bei 4 °C für 30 Minuten.

Es schloss sich der Zellaufschluss mittels Ultraschall (dreimal 30 Sekunden, 60 % Power) auf Eis an. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (4 °C, 14000 rpm, 20 Minuten) und der das lösliche Protein enthaltene Überstand wurde bis zur weiteren Analyse bei 4 °C gelagert.

Die Reinigung von His-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie

Die die rekombinant hergestellten His-Fusionsproteine enthaltenden löslichen Proteinrohextrakte aus *Escherichia coli* wurden mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Hierfür wurden zunächst 4 ml *Talon Superflow Metal Affinity Resin* (Clontech) bei 4 °C und 1500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und zweimal mit je 3 ml Extraktionspuffer äquilibriert. Nachfolgend wurde der Proteinrohextrakt mit der Talon-Matrix gemischt und bei 4 °C unter Schütteln für zwei Stunden inkubiert. Die Matrix wurde auf 2 ml Einwegsäulen (Clontech) verteilt und mittels diskontinuierlichen Imidazol-Gradienten (je 3 ml 30 mM, 60 mM, 240 mM Imidazol in Extraktionspuffer) eluiert. Alle Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung auf Vorhandensein und Reinheit des rekombinant hergestellten Proteins untersucht (siehe 2.9.5).

2.9.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte mittels SDS-PAGE. Hierfür wurden die Protein-Proben mit zweifach Probenpuffer [pH 6,8; 0,125 M Tris; 5 mM EDTA; 15 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt und durch Erhitzen auf 95 °C für fünf Minuten denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA [Laufpuffer: 200 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS]. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes fand der Proteinmarker *Precision Plus Protein™ DualColor*-Standards (BioRad) Verwendung. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach der Auftrennung der Proteine für die Western Blot-Analyse (siehe 2.9.6) verwendet oder mit Coomassie-Färbelösung [10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol, 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250] gefärbt. Nach dem Entfärben der Gele mit Entfärbe-Lösung [10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol] wurden die Gele mit Hilfe des Geldokumentationssystems *BioDoc Analyze* (Whatmann Biometra) unter Weißlicht fotografiert oder gescannt.

2.9.6 Der spezifische Nachweis von Proteinen (Western Blot-Analyse)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung (siehe 2.9.5) erfolgte der Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen [*Trans-Blot TransferMedium Pure Nitrocellulose*-Membran (0,2 μ m); BioRad] nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) mittels einer *semi-dry-blotting*-Apparatur [Transferpuffer: 200 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,075 % (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol]. Nachfolgend wurde die Membran mit 5 % (w/v) BSA in TBST [pH7,5; 20 mM Tris; 150 mM Natriumchlorid; 0,05 % (v/v) Tween 20] über Nacht bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper anti-SIAOC [Verdünnung: 1:5000 in 5 % (w/v) BSA in TBST] erfolgte bei Raumtemperatur für drei Stunden. Nach viermaligem Waschen der Membran mit TBST schloss sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper anti-

Kaninchen IgG₁, konjugiert mit alkalischer Phosphatase [Chemicon International; Verdünnung: 1:5000 in 5 % (w/v) BSA in TBST], für eine Stunde bei Raumtemperatur an. Nach weiteren vier Waschschritten wurde die Membran in Reaktionspuffer (pH 9,5; 100 mM Tris; 100 mM Natriumchlorid; 50 mM Magnesiumchlorid) äquilibriert. Durch die Zugabe von 0,16 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und 0,32 mg/ml *p*-Nitroblautetrazoliumchlorid wurde die Farbreaktion gestartet, welche nach ausreichender Farbentwicklung durch Waschen mit TE-Puffer [pH 8,0; 10 mM Tris; 1 mM EDTA] abgestoppt wurde. Abschließend wurde die Membran zur Dokumentation gescannt.

2.9.7 Der gekoppelte Enzym-Aktivitätstest

Die Bestimmung der AOC Enzym-Aktivität mittels gekoppeltem Enzym-Aktivitätstest wurde nach Ziegler *et al.* (1997, 1999) modifiziert. Hierfür kamen je nach Zielstellung 1 µg rekombinant hergestellte AOC (2.8.2 und 2.9.4) bzw. 35 µg Proteinrohextrakt aus Pflanzenmaterial (siehe 2.9.1) zur Anwendung. Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 200 µl enthielt weiterhin 50 µl *HvAOS1* (4 nkat, Ziegler *et al.*, 2000) und 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 40 nmol 13(S)-HPOT initiiert. Nach einer Reaktionszeit von zehn Minuten auf Eis wurde die Reaktion durch Ansäuern (40 µl 2 N Salzsäure) abgestoppt. Nach Zugabe von 13,3 nmol Methyl-OPDA (interner Standard) wurde der Ansatz zweimal mit je 1 ml Diethylether extrahiert und bis zur vollständigen Trockene eingeengt. Die Umwandlung des enzymatisch gebildeten *cis*-(+)-OPDA [9(S),13(S)-OPDA] in die *trans*-Form erfolgte durch Aufnehmen der Probe in 300 µl Methanol und Zugabe von 35 µl 2 N Natriumhydroxid. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde auf Eis wurde die Reaktion durch Neutralisieren mit 40 µl 2 N Salzsäure gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz zweimal mit je 1 ml Diethylether extrahiert. Die nachfolgende präparative HPLC wurde an einer *Eurospher100 C18 4 mm* (Macherey-Nagel) durchgeführt, wobei als Lösungsmittel A: Methanol sowie als Lösungsmittel B: 0,2 % (v/v) Essigsäure in Wasser Verwendung fanden (isokratische Trennung: 75 % Lösungsmittel A; Fraktion: Retentionszeit 12,0-13,4 Minuten). Die Trennung der so erhaltenen Fraktion in die entsprechenden isomeren Formen [*trans*-(+)- bzw. *trans*-(-)-OPDA] wurde an einer chiralen Säule [*EC 200/4 Nucleotex beta-PM* (Macherey-Nagel)] durchgeführt. Als Lösungsmittel A kam Methanol und als Lösungsmittel B kam 0,2 % (v/v) Essigsäure in Wasser zum Einsatz (isokratische Trennung: 65 % Lösungsmittel A). Der absolute Betrag des in den Proben enthaltenen OPDA wurde mit Hilfe des internen Standards quantifiziert. Nachfolgend wurde der Anteil des enzymatisch gebildeten OPDA an dem gesamten in der Probe enthaltenen OPDA über den Vergleich der beiden enantiomeren Formen ermittelt.

Für die Untersuchungen zur Substratspezifität wurden die bereits erwähnten Komponenten des gekoppelten Enzym-Aktivitätstests verwendet. Als Substrate wurden jedoch 13(S)-HPOTE, 13(S)-HPOD, 11(S)-HPHT, 15(S)-HPETE, 15(S)-HPEP, 9(S)-HPOT sowie 9(S)-HPOD eingesetzt. Nach Initiation der Enzymreaktion durch Zugabe des Substrates und einer Inkubation über einen Zeitraum von 30 Minuten auf Eis wurde die Reaktion durch Ansäuern abgestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zweimal mit je 1 ml Diethylether extrahiert. Die Analyse der gebildeten Produkte erfolgte freundlicherweise durch Herrn Dr. Otto Miersch (IPB Halle) mittels GC-MS.

2.9.8 Die Gehaltsbestimmung von OPDA, JA, 12-OH-JA und JA-Ile

Die Bestimmung der OPDA- und Jasmonat-Gehalte erfolgte nach Miersch *et al.* (2008). Hierfür wurde Pflanzenmaterial unter flüssigen Stickstoff gemörsert und eingewogen. Jeweils 1 g der entsprechenden Probe wurde mit 10 ml Methanol und den internen Standards (je 100 ng [$^2\text{H}_6$]JA, [$^2\text{H}_5$]OPDA, 12- $^2\text{H}_3$ -OH-JA, [$^2\text{H}_3$]JA-Ile) versetzt. Nachfolgend wurden die homogenisierten und filtrierten Proben bis zur vollständigen Trockene eingeeengt und über Nacht bei 20 °C mit 200 µl Pyridin und 100 µl Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach dreimaligem Waschen der Extrakte mit je 3 ml Ethanol wurden diese getrocknet und in 10 ml Methanol gelöst. Anschließend erfolgte die Reinigung der Proben mit Hilfe von mit *DEAE-Sephadex A25* (Amersham Pharmacia Biotech AB) gefüllter Säulen [Waschen der Säule: je 3 ml Methanol, 0,1 N (v/v) sowie 1 N (v/v) Essigsäure in Methanol; Elution: je 3 ml 1,5 N (v/v) sowie 3 N (v/v) Essigsäure in Methanol]. Die nachfolgende präparative HPLC wurde an einer *Eurospher100 C18 Säule* (5 µm, 250 x 4 mm; Knauer) durchgeführt, wobei als Lösungsmittel A: Methanol sowie als Lösungsmittel B: 0,2 % (v/v) Essigsäure in Wasser Verwendung fanden [linearer Gradient: 40 % zu 100 % Lösungsmittel A innerhalb von 25 Minuten; Fraktionen: Retentionszeit 11,9-13,3 Minuten (12-OH-JA), 15,0-16,4 Minuten (JA), 18,5-19,9 Minuten (JA-Ile) und 22,7-24,1 Minuten (OPDA)]. Die nachfolgend getrockneten Fraktionen wurden in 200 µl CHCl_3 /*N,N*-Diisopropylethylamin (1:1, v/v) gelöst und mit 10 µl Pentafluorobenzylbromid über Nacht bei 20 °C derivatisiert. Nach dem Einengen bis zur vollständigen Trockene wurden die Proben in 5 ml n-Hexan gelöst und auf eine *Chromabond-SiOH-Säule* (500 mg, Macherey-Nagel) gegeben. Nach der Elution der Pentafluorobenzylester mit Hilfe von 5 ml n-Hexan/Diethylether (2:1, v/v) wurden die Eluate getrocknet und in 100 µl CH_3CN gelöst. Die Quantifizierung mittels GC-MS übernahm freundlicherweise das Labor unter Leitung von Prof. Dr. Claus Wasternack (IPB Halle).

2.9.9 Die Gehaltsbestimmung von IAA und ACC

Für die Bestimmung der Gehalte von ACC und freier IAA wurde Pflanzenmaterial von fünf Einzelstecklingen (1 cm der Stecklingsbasis) vereinigt, unter flüssigen Stickstoff gemörsert und eingewogen. Jeweils 0,5 g Pflanzenmaterial wurden mit 10 ml Methanol und den entsprechenden internen Standards (je 500 ng [$^{13}\text{C}_6$]IAA, [$^2\text{H}_4$]ACC) versetzt. Die Reinigung der Proben erfolgte mit Hilfe von mit *DEAE-Sephadex A25* gefüllter Säulen [je einmal 3 ml Methanol, 0,1 N, 1 N und 1,5 N (v/v) Essigsäure in Methanol sowie viermal 3 N (v/v) Essigsäure in Methanol]. Dabei enthielten der erste Durchfluss sowie die Methanol-Fraktion ACC (Eluat I) und mit Hilfe der 3 N (v/v) Essigsäure in Methanol wurde freie IAA (Eluat II) eluiert.

Aufarbeitung Eluat I:

Das bis zur vollständigen Trockene eingeeengte Eluat I wurde in 5 ml dest. Wasser mittels Ultraschallbad gelöst und auf eine *LiChrolutRP-18-Kartusche* (Merck) gegeben. Die Säule wurde nachfolgend mit 2 ml dest. Wasser gewaschen, wobei sowohl der Durchlauf als auch das dest. Wasser des Waschschriffs ACC enthielten. Die getrocknete Probe wurde in 200 µl CHCl_3 /*N,N*-Diisopropylethylamin (1:1, v/v) gelöst und mit 10 µl Pentafluorobenzylbromid über Nacht bei

20 °C derivatisiert. Nach dem Trocknen wurden die Proben in 5 ml n-Hexan gelöst und auf eine *Chromabond-SiOH*-Säule (500 mg, Machery-Nagel) gegeben. Nach der Elution der Pentafluorobenzylester mit Hilfe von 7 ml n-Hexan/Diethylether (2:1, v/v) wurden die Eluate bis zur vollständigen Trockene eingengt und in 100 µl CH₃CN gelöst. Die Quantifizierung mittels GC-MS übernahm freundlicherweise das Labor unter Leitung von Prof. Dr. Claus Wasternack (IPB Halle).

Aufarbeitung Eluat II:

Die präparative HPLC erfolgte wie unter Punkt 2.9.8 beschrieben (IAA-Fraktion: Retentionszeit 10,5-11,9 Minuten). Die getrocknete Fraktion wurde in 100 µl Methanol gelöst und mit Hilfe von 300 µl Diazomethan für 10 Minuten bei Raumtemperatur methyliert. Nach nochmaligem Trocknen der Proben wurde diese in 70 µl CH₃CN gelöst. Die Quantifizierung mittels GC-MS übernahm freundlicherweise das Labor unter Leitung von Prof. Dr. Claus Wasternack (IPB Halle).

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Die Einbettung von Pflanzenmaterial in Polyethylenglycol (PEG)

Das entsprechende Pflanzenmaterial wurde in Stücke von ca. 3 x 5 mm geschnitten und nach kurzer Vakuuminfiltration für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Fixierlösung [4 % (w/v) Paraformaldehyd, 0,1 % (v/v) Triton-X-100 in PBS] inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (pH 7,2; 135 mM Natriumchlorid; 3 mM Kaliumchlorid; 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat) war es zunächst erforderlich das Pflanzenmaterial zu dehydrieren (Tabelle 2-6) und nachfolgend mit PEG zu infiltrieren. Die Infiltration der Proben mit PEG 1500 erfolgte über fünf Stufen (3:1, 1:1, 1:3 Ethanol/ PEG, zweimal reines PEG) für jeweils eine Stunde bei 55 °C. Das Pflanzenmaterial wurde abschließend mit PEG in Einbettungsformen überführt und nach dem vollständigen Aushärten bei 4 °C gelagert.

2.10.2 Die Immunmarkierung von Dünnschnitten

Um Dünnschnitte von in PEG eingebettetem Pflanzenmaterial anzufertigen, kam das Mikrotom *HM 325* (Microm) zur Anwendung. Die entsprechenden 20 µm Schnitte wurden in *Tissue Culture-Inserts* (10 mm mit 0,8 µm Polykarbonat-Membran; Nunc) transferiert. Alle anschließenden Behandlungsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur in *Multiwell Plates for Culture* (24 wells; Greiner Bio-One). Zunächst wurden die Dünnschnitte zweimal zehn Minuten mit PBS gewaschen und für fünf Minuten mit 0,1 M Ammoniumchlorid in PBS behandelt. Nach nochmaligem Waschen mit PBS und der Behandlung mit 5 % (w/v) BSA in PBS für eine Stunde erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper anti-SIAOC oder dem Präimmenserum (Verdünnung: 1:1000 in 5 % (w/v) BSA in PBS) über Nacht bei 4 °C. Die Schnitte wurden dreimal mit 0,1 % (w/v) BSA in PBS und einmal mit 1 % (w/v) BSA in PBS gewaschen. Es schloss sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper anti-Kaninchen IgG konjugiert mit AlexaFluor488 [Molecular Probes; Verdünnung: 1:500 in 5 % (w/v) BSA in PBS] für zwei Stunden bei 37 °C an. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 15 Minuten mit 0,1

$\mu\text{g/ml}$ DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma) in PBS gegengefärbt und noch zwei weitere Male mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte auf Objektträger transferiert, mit *Citifluor-Glycerol/PBS-Solution AF1* (Agar Scientific) eingeschlossen und bis zur weiteren Analyse bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Analyse der immunmarkierten und gefärbten Schnitte erfolgte mit Hilfe eines *Confocal Laser Scanning*-Mikroskops (CLSM 510-Meta; Zeiss) mit den in Tabelle 2-7 angegebenen Einstellungen und der Zeiss *CLSM 510-Meta*-Software. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit Hilfe der *Adobe Photoshop 6.0*-Software durchgeführt.

Tabelle 2-6: Aufsteigende Ethanol-Reihe zur Dehydrierung von Pflanzenmaterial.

Ethanol-Konzentration in % (v/v)	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
10	30 Minuten	Raumtemperatur
30	60 Minuten	Raumtemperatur
50	60 Minuten	Raumtemperatur
70	12 Stunden	4 °C
90	30 Minuten	Raumtemperatur
100	30 Minuten	Raumtemperatur
100	30 Minuten	55 °C

Tabelle 2-7: Kanaleinstellungen am CLSM 510 Meta bei der Auswertung der immunmarkierten und gefärbten Schnitte. LP: Langpassfilter; BP: Bandpassfilter.

Anregungswellenlänge	Emissionsfilter	Fluoreszenzsignal
488 nm	BP505-530	AlexaFluor488
350 nm	LP385	DAPI

2.10.3 Die Bestimmung der Primordienanzahl in der Stecklingsbasis

Um die Anzahl der Primordien in den Stecklingen zu ermitteln, wurde Material der Stecklingsbasis (0,5 cm) nach kurzer Vakuuminfiltration für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur in Fixierlösung [2 % (v/v) Formaldehyd, 0,1 % (v/v) TritonX-100 in MTSB (pH 6,9; 50 mM PIPES, 5 mM Magnesiumsulfat, 5 mM EGTA)] inkubiert. Die fixierten Stängelstücke wurden mit Cyanacrylat-Kleber auf einen Probenteller geklebt. Nachfolgend wurden 300 μm dicke Längsschnitte mit Hilfe des Mikrotoms *VT1000S* der Firma Leica (Einstellungen: Speed 9; Frequenz 0,9) angefertigt. Nach dem Transfer der Schnitte auf Objektträger erfolgte die Auszählung der Primordien mittels Lichtmikroskop (*Axioplan*; Carl Zeiss AG).

2.11 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit Hilfe der *Excel*- und *SPSS 17.0*-Software. Alle metrischen Daten wurden auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Varianzhomogenität (Levene-Test) geprüft. Die Untersuchung unabhängiger Stichproben erfolgte für alle normalverteilten Variablen mittels t-Test nach Student und für alle nicht normalverteilten mittels U-Test nach Mann-Whitney. Alle Werte $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Im Garten- und Zierpflanzenbau wird die Regenerationsfähigkeit bestimmter Pflanzen genutzt, um diese über die Bewurzelung von Stecklingen vegetativ zu vermehren. Infolge des Abtrennens der zur Bewurzelung vorgesehenen Seitentriebe von der Mutterpflanze wird die Pflanze verwundet. Die daraus resultierende Wundantwort hat die Heilung des geschädigten Gewebes und die Aktivierung von Abwehrmechanismen zur Folge. Die Rolle von Jasmonaten im Mechanismus der Wundantwort ist hinreichend beschrieben. Inwiefern Änderungen der Jasmonat-Biosynthese während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen auftreten bzw. ob modulierte Jasmonat-Gehalte die Regeneration von Adventivwurzeln beeinflussen, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

3.1 Die Jasmonat-Biosynthese während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen

Um mögliche Änderungen der Jasmonat-Biosynthese während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen nachzuweisen, wurden die endogenen Gehalte der Jasmonate in den Stecklingen analysiert. Weiterhin sollten das Schlüsselenzym der Jasmonat-Biosynthese, die AOC, in Bezug auf Änderungen in der enzymatischen Aktivität und der Expression des kodierenden Gens hin untersucht werden. Zu Beginn dieser Arbeit standen noch keine Sequenz-Informationen für das für die AOC aus *Petunia hybrida* (*PhAOC*) kodierende Gen zur Verfügung. Deshalb wurde, wie im folgenden Abschnitt dargestellt, die cDNA der *PhAOC* isoliert und charakterisiert.

3.1.1 Die Isolierung und Charakterisierung der *PhAOC*

3.1.1.1 Die Isolierung der *PhAOC* cDNA

Für die Isolierung der *PhAOC* cDNA wurde ausgehend von Gesamt-RNA aus *Petunia*-Keimlingen die Erststrang cDNA synthetisiert. Die Amplifizierung der cDNA mittels PCR erfolgte mit einem degenerierten Oligonukleotid und einem Oligonukleotid, das das Poly-A-Ende der mRNA erkennt. Ersterer basierte auf einem Vergleich der bekannten AOC AS-Sequenzen von *Solanum lycopersicum* (AF384374), *Nicotiana tabacum* (AJ308487) und *Solanum tuberosum* (AY135641) und wurde von der konservierten Region FYFGDYG abgeleitet. Die Sequenzierung der amplifizierten DNA und die nachfolgende Sequenzanalyse führten zur Identifizierung eines 412 Basenpaar (bp) großen Fragments. Dieses wies eine hohe Sequenz-Homologie zu bereits bekannten AOCs auf und umfasste den 3'-Bereich der kodierenden Sequenz, die 3'-untranslatierte Region sowie das Poly-A-Ende. Um die vollständige Sequenz der cDNA zu erhalten, wurde eine 5' RACE-PCR durchgeführt. Hierfür wurden vom bekannten 3'-Ende der *PhAOC* cDNA Gen-spezifische Oligonukleotide abgeleitet, mit deren Hilfe die vollständige Nukleotid-Sequenz mittels PCR amplifiziert werden konnte (siehe 2.8.1 sowie Anhang, Abbildung 6-1 A).

Der offene Leserahmen der *PhAOC* cDNA (732 bp) kodiert für ein 234 AS langes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht (MG) von 26,5 kDa. Die Analyse der AS-Sequenz^{2,3} zeigt

² <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>

te, dass die für die Aktivität der *Arabidopsis thaliana* (At)AOC2 unabdingbaren AS Glutaminsäure, Asparagin und Prolin (Hofmann *et al.*, 2006; Schaller *et al.*, 2008) in der PhAOC konserviert vorliegen (Abbildung 3-1; blau unterlegt) und sagte zwei mögliche Prozessierungsstellen zwischen AS 48/49 sowie AS 78/79 für ein Chloroplasten-Transit-Peptid im N-terminalen Bereich der PhAOC voraus (Abbildung 3-1; rot unterlegt). Ferner konnten mit Hilfe der *NetPhos 2.0*⁴-Software zwölf mögliche Phosphorylierungsstellen (Abbildung 3-1; blauer Pfeil) und mit Hilfe der *NetOGlyc 3.1*⁵-Software sechs mögliche O-Glykosylierungsstellen (Abbildung 3-1; roter Pfeil) gefunden werden, wobei deren Funktionalität im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

PhAOC	1	MAIASSASAALRRTTSSSSFLASSFPPT---QKIQSFKLPNPL-----ISKTLKLETS--TNSKSFY
SlAOC	1	..TV.....I...S..S.A.-Q---K.....QNH..T.TST.A.R..S
StAOC	1	..TV.....AI...Y..P.A.QI.SLS...L.....Q.H..T.TST.A.R..S
NtAOC	1	..T.....I...A--T...SAS...R.....QS...G.....
AtAOC2	1	..SSAVSLQSI SM .TLN ^{NL} SLC ^{NQ} .HRS---SLLG.S.SFQ ^N .GISSNGSDF.YPSSFTAK--K.LTASR
PhAOC	58	CKSQSSSTDSTN-TKVQEL ^S WYEMNERDRGSEAYLRLSOKTVNSLGD ^L VPFSNKL ^Y TGDLK ^R IGITAGL
SlAOC	59T.....-E.....I.....A.....
StAOC	63	...N.....-E.....L.....N.....A.....
NtAOC	60	...G...ST...L...N.....
AtAOC2	66	AL..NGNIENRPS.....I...L.H..KI.KNAFSLMFG.....T.....V.....
PhAOC	127	CILIKHEEEKKGD ^R YEAIYSFYFGDYGHIAVQGSYLTYEDTYLAVTGGSGIFAGVSGQVKLQ ^Q IIFPFKL
SlAOC	128V.....A.....E.....L.....
StAOC	132V.....Q.....S.....L.....
NtAOC	129V.....Q.....S.....L.....
AtAOC2	136	.VV.E.VP...E.F.T.....LS..P.....SF..I..A..E.AY.....LVY.T..
PhAOC	197	FYTFYLKGIP-DLPSELLGTAVAPSP ^T VEPSPEAKACEAGATVK ^N FTN
SlAOC	198-G.....C..P.....T.....E..AL..Y..
StAOC	202-C..P.....T.....D..AL..Y--
NtAOC	199-.....V..P.....A.....L.....
AtAOC2	206LAN...L.T..P.P..KDI..A.....L.PSGVIS.Y..

Abbildung 3-1: Die AS-Sequenz der PhAOC sowie ein Sequenzvergleich der PhAOC mit anderen AOCs aus der Familie der *Solanaceae* und der AtAOC2. Unterschiedliche AS sind rot und ähnliche AS sind grün dargestellt. Mögliche Prozessierungsstellen sind rot und die für die Aktivität der AtAOC2 wichtigen, konservierten AS sind blau unterlegt. Mögliche Phosphorylierungsstellen sind mit blauen Pfeilen und mögliche O-Glykosylierungsstellen sind mit roten Pfeilen angezeigt.

Im Weiteren wurden die PhAOC sowie 14 andere bereits bekannte AOCs mit Hilfe der *Clone Manager Professional Suite*-Software auf mögliche Sequenz-Homologien hin untersucht. Dabei zeigte die vergleichende Analyse, dass die PhAOC die größten Ähnlichkeiten zu den AOCs aus der Familie der *Solanaceae* aufwies (Abbildung 3-1). Die Sequenz-Homologie der PhAOC betrug gegenüber der *Nicotiana tabacum* AOC (NtAOC): 91 %, der *Solanum lycopersicum* AOC (SlAOC): 85 % sowie der *Solanum tuberosum* AOC (StAOC): 83 %. Große Ähnlichkeiten waren auch im Vergleich zu den AOCs aus den Familien der *Brassicaceae* (50 - 56 %), *Fabaceae* (61 –

³Clone Manager Professional Suite-Software

⁴ <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

⁵ <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

64 %), *Poaceae* (53 – 58 %) sowie *Cannabaceae* (69 %) nachzuweisen (Anhang, Abbildung 6-2).

Neben den in diesem Kapitel dargestellten Ergebnissen klärte Frau Daniela Kleen im Rahmen ihrer Diplomarbeit die Intron-Exon-Struktur des *PhAOC* Gens auf (Anhang, Abbildung 6-1 B) und wies nach, dass das Gen in einfacher Kopie im Genom von *Petunia hybrida* vorliegt (Kleen, 2007).

3.1.1.2 Die funktionelle Charakterisierung der PhAOC

Für die funktionelle Charakterisierung der PhAOC war es erforderlich, das Protein in *Escherichia coli* heterolog zu exprimieren. Hierfür fand das Vektor-System pET28a(+) Verwendung, welches eine IPTG-induzierte Überexpression von Histidin (His)-Fusionsproteinen (rekombinantes Protein mit C-terminalen His) in *Escherichia coli* ermöglicht. Zunächst erfolgte die Amplifizierung des kodierenden Teils der *PhAOC* cDNA mittels PCR. Die dafür verwendeten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass dem rekombinanten Protein das vorhergesagte Transit-Peptid fehlen sollte. Wie unter 3.1.1.1 dargestellt, wäre eine Prozessierung an zwei Stellen des Proteins möglich. Für die nachfolgend beschriebene heterologe Expression wurde die Prozessierungsstelle zwischen AS 48/49 ausgewählt. Nach erfolgreicher Insertion des amplifizierten DNA-Fragments in den Expressionsvektor wurde das rekombinante Protein im *Escherichia coli*-Stamm BL21 als lösliches Protein exprimiert. Die Expression und die Reinigung des His-Fusionsproteins erfolgten, wie unter 2.8.2 sowie 2.9.4 beschrieben.

Die Proteinrohextrakte der mit dem leeren Vektor [p28a(+)] bzw. dem Expressionsvektor [p28a(+)*PhAOC*] transformierten Zellen und das mittels Affinitätschromatographie gereinigte His-Fusionsprotein wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3-2 A). Im Vergleich zu den Kontrollen [p28a(+): Bahn 1 und p28a(+)*PhAOC* ohne IPTG Bahn 2] erschien nach IPTG-Induktion eine zusätzliche ca. 25 kDa große Bande in den Proteinrohextrakten der mit dem p28a(+)*PhAOC* transformierten Zellen (Bahn 3; roter Pfeil oben). Neben dieser war in der gereinigten Fraktion eine weitere ca. 23 kDa große Protein-Bande (Bahn 4; roter Pfeil unten) nachzuweisen. Bei der 23 kDa großen Protein-Bande handelte es sich jedoch nicht um das rekombinante His-Fusionsprotein, da mit Hilfe des anti-His-Tag Antikörpers nur die 25 kDa große Bande spezifisch nachgewiesen wurde (Abbildung 3-2 B; Bahn 1).

Wie bereits unter 3.1.1.1 dargestellt, zeigte die vergleichende Analyse der AS-Sequenzen, dass die PhAOC die größten Ähnlichkeiten zu den AOCs aus der Familie der *Solanaceae* aufwies. Deshalb wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht, ob ein anti-SIAOC Antikörper (Hause *et al.*, 2000) für den spezifischen Nachweis der PhAOC Verwendung finden konnte. Hierfür wurden sowohl die gereinigte Fraktion des rekombinanten Proteins als auch ein Proteinrohextrakt aus *Petunia* in Bezug auf eine spezifische Erkennung durch den Antikörper hin untersucht. Im pflanzlichen Proteinrohextrakt (Abbildung 3-2 B, Bahn 3) wurden zwei Protein-Banden durch den anti-SIAOC Antikörper erkannt. Das MG der kleineren Bande betrug ca. 23 und das der größeren ca. 50 kDa. Da für die PhAOC ohne Transit-Peptid ein ähnliches Molekulargewicht vorhergesagt wurde, ist anzunehmen, dass es sich bei der kleineren Bande um die PhAOC handelt. Bei der

50 kDa Bande war eine unspezifische Bindung des Antikörpers wahrscheinlich. Ebenso war ein spezifischer Nachweis in der gereinigten Fraktion des rekombinant hergestellten Proteins möglich (Abbildung 3-2 B, Bahn 2). Der anti-SIAOC Antikörper erkannte sowohl die 25 kDa große als auch die 23 kDa große Bande. Aufgrund des spezifischen Nachweises durch den anti-SIAOC Antikörper und der fehlenden Erkennung durch den anti-His-Tag Antikörper könnte es sich bei der 23 kDa großen Bande um ein Abbau-Produkt des rekombinanten Proteins handeln. Dieser Sachverhalt wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

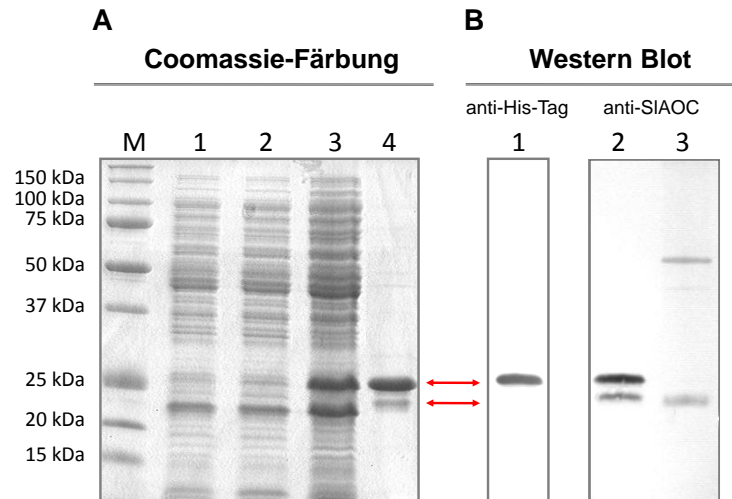


Abbildung 3-2: Heterologe Expression der PhAOC in *Escherichia coli* und Spezifitätstest des anti-SIAOC Antikörpers. **(A)** SDS-PAGE (siehe 2.9.5; 20 µg Protein je Bahn, Coomassie-Färbung): **M** Proteinmarker, Proteinrohextrakte von: **1** p28a(+) ohne IPTG, **2** p28a(+)PhAOC ohne IPTG **3** p28a(+)PhAOC mit IPTG, **4** gereinigtes rekombinantes His-Fusionsprotein; **(B)** Western Blot-Analyse (siehe 2.9.6): **1** gereinigtes rekombinantes His-Fusionsprotein (0,1 µg Protein je Bahn, anti-His-Tag Antikörper), **2** gereinigtes rekombinantes His-Fusionsprotein (0,1 µg Protein je Bahn, anti-SIAOC Antikörper), **3** Proteinrohextrakt aus Stängelmaterial von *Petunia* (10 µg Protein je Bahn, anti-SIAOC Antikörper).

Im nächsten Schritt sollte sichergestellt werden, dass es sich beim rekombinanten Protein um eine enzymatisch aktive AOC handelte. Hierfür kam ein gekoppelter Enzym-Aktivitätstest zur Anwendung (Abbildung 3-3). Dieser basiert auf der Umsetzung des natürlichen Substrats 13(S)-HPOT durch die AOS zu 12,13-EOT. Das Allenoxid 12,13-EOT ist instabil und würde ohne enzymatische Kontrolle spontan zu α - und γ -Ketol hydrolysieren. Gleichzeitig würde sich infolge einer spontanen Cyclisierung des Allenoxids ein racemisches Gemisch bestehend aus 50 % 9(S),13(S)- sowie 50 % 9(R),13(R)-OPDA bilden. In Anwesenheit der AOC wird 12,13-EOT enzymatisch umgesetzt, was die ausschließliche Bildung von 9(S),13(S)-OPDA zur Folge hat. Der enantiomere Überschuss des S,S-Isomers (Differenz von 9(S),13(S)- und 9(R),13(R)-OPDA) kann dabei als direktes Maß für das Ausmaß der enzymatischen Umsetzung angesehen werden.

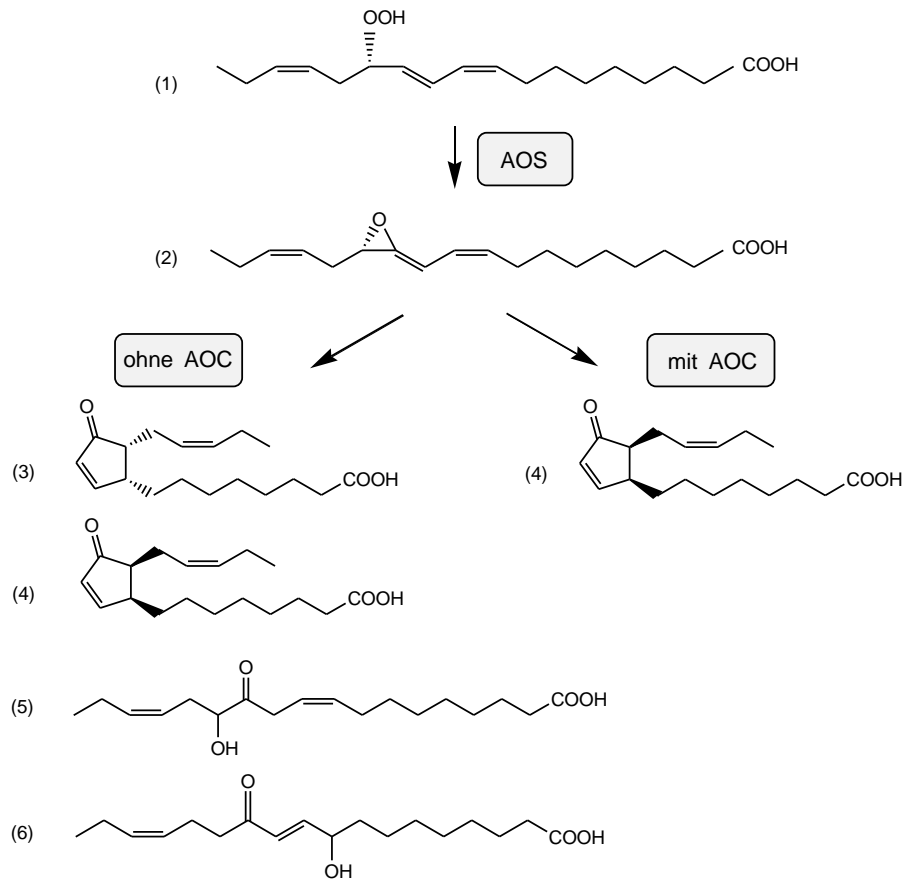


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des gekoppelten Enzym-Aktivitätstests für den Nachweis einer AOC-Aktivität (siehe auch 2.9.7). **(1)** 13(S)-HPOT; **(2)** 12,13-EOT; **(3)** 9(R),13(R)-OPDA; **(4)** 9(S),13(S)-OPDA; **(5)** α-Ketol [12-Oxo-13-hydroxy-9(Z),15(Z)-octadecadiensäure]; **(6)** γ-Ketol [12-Oxo-9-hydroxy-10(E),15(Z)-octadecadiensäure].

Wie in Tabelle 3-1 dargestellt, wurde in den Proteinrohextrakten der mit dem p28a(+) transformierten Bakterien keine enzymatisch gebildete OPDA detektiert. Im Vergleich dazu war in den Proteinrohextrakten der mit den p28a(+)PhAOC transformierten Bakterien eine hohe spezifische Aktivität von 1606 nmol OPDA/mg eingesetztes Protein nachweisbar. Weiterhin zeigte die sterische Analyse der im Enzym-Aktivitätstest entstandenen Reaktionsprodukte, dass das rekombinant hergestellte Protein ausschließlich die Bildung von 9(S),13(S)-OPDA katalysierte. Im Vergleich dazu lag der prozentuale Anteil der 9(S),13(S)-OPDA am Gesamt-OPDA im Kontrollansatz [p28a(+)] bei 51,7 %, was für eine spontane Cyclisierung des Allenoxids in diesem Ansatz spricht.

Zur weiteren Charakterisierung des rekombinanten Proteins fanden im gekoppelten Enzym-Aktivitätstest auch andere dem 13(S)-HPOT ähnliche Substanzen Verwendung (Anhang, Tabelle 6-9). Die Analyse der dabei entstandenen Reaktionsprodukte erfolgte ausschließlich qualitativ, das heißt, es wurde nur untersucht, ob ein Umsatz des verwendeten Substrats erfolgte oder nicht. Mit Hilfe dieses Ansatzes wurde gezeigt, dass das rekombinante His-Fusionsprotein neben

13(S)-HPOT auch 13(S)-HPOTE⁶, 11(S)-HPHT⁷ sowie 15(S)-HPEP⁸ enzymatisch umsetzte. Für die anderen verwendeten Substanzen waren keine Reaktionsprodukte nachweisbar.

Tabelle 3-1: Nachweis der AOC-Aktivität mittels gekoppeltem Enzym-Aktivitätstests. Der Enzym-Aktivitätstest erfolgte wie unter 2.9.7 beschrieben. Pro Ansatz wurden 20 µg des jeweiligen Proteinrohextraktes eingesetzt.

	Spezifische AOC-Aktivität		Prozentualer Anteil 9(S),13(S)-OPDA am Gesamt-OPDA [%]
	Enzymatisch gebildete OPDA [nmol/mg Protein]	Prozentualer Anteil [%]	
p28a(+)	7	0,4	51,7
p28a(+) <i>PhAOC</i>	1606	100	97,2

Alles in Allem zeigen diese Ergebnisse, dass die aus *Petunia hybrida* isolierte cDNA für die AOC kodiert. Der Nachweis erfolgte zum einen mit Hilfe eines anti-SIAOC Antikörpers, der das in *Escherichia coli* heterolog exprimierte Protein spezifisch erkannte. Weiterhin war es möglich, mittels gekoppelten Enzym-Aktivitätstests nachzuweisen, dass es sich bei dem rekombinant hergestellten Protein um eine enzymatisch aktive AOC handelte. Somit standen durch die Aufklärung der Nukleotid-Sequenz der *PhAOC* cDNA und den als spezifisch getesteten anti-SIAOC Antikörper wichtige Werkzeuge für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung.

3.1.2 Die Jasmonat-Biosynthese während der Stecklingsbewurzelung

Um mögliche Änderungen in der Jasmonat-Biosynthese während der Stecklingsbewurzelung nachzuweisen, war es zunächst erforderlich, Kopfstecklinge von *Petunia hybrida* in einem mit feuchtem Perlit gefüllten Minigewächshaus zu bewurzeln (siehe 2.3.2). Nach ungefähr neun Tagen zeigten sich an der Basis der Stecklinge erste Adventivwurzeln, weshalb sich alle weiteren Untersuchungen auf einen Zeitraum von 0 bis 216 Stunden beschränkten. Das für die Untersuchungen benötigte Pflanzenmaterial wurde 0; 0,5; 1; 2; 6; 12; 24; 48; 72; 120; 168; 216 Stunden nach der Stecklingsernte in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Für alle unter Punkt 3.1.2 sowie 3.2 aufgeführten Analysen fand ausschließlich Stängelmaterial (1 cm Stecklingsbasis) Verwendung.

⁶ 13(S)-Hydroperoxy-6(Z),9(Z),11(E),15(Z)-octadecatetraensäure

⁷ 11(S)-Hydroperoxy-7(Z),9(E),13(Z)-hexadecatriensäure

⁸ 15(S)-Hydroperoxy-5(Z),8(E),11(Z),13(E),17(Z)-eicosapentaensäure

3.1.2.1 Die Jasmonat-Gehalte während der Stecklingsbewurzelung

In einem ersten Experiment wurden die Gehalte von OPDA, einem biologisch aktiven Intermediat der Jasmonat-Biosynthese, und von JA analysiert. Auf Abbildung 3-4 a ist zu erkennen, dass der Gehalt von JA bereits nach 30 Minuten auf einen maximalen Wert von 1290 pmol JA/ g Frischgewicht (FG) anstieg. Anschließend verringerte sich der Gehalt und erreichte nach sechs Stunden den Ausgangswert von ca. 100 pmol/g FG. Im Vergleich dazu stieg der OPDA-Gehalt 30 Minuten nach Ernte auf nur 410 pmol/g FG an und verblieb zunächst auf diesem Niveau. Nach 24 Stunden wurde der Ausgangswert von 60 pmol/g FG erreicht. Bis zum Erscheinen erster Adventivwurzeln an der Stecklingsbasis waren keine weiteren Änderungen der OPDA- bzw. JA-Gehalte nachweisbar (Abbildung 3-4 A).

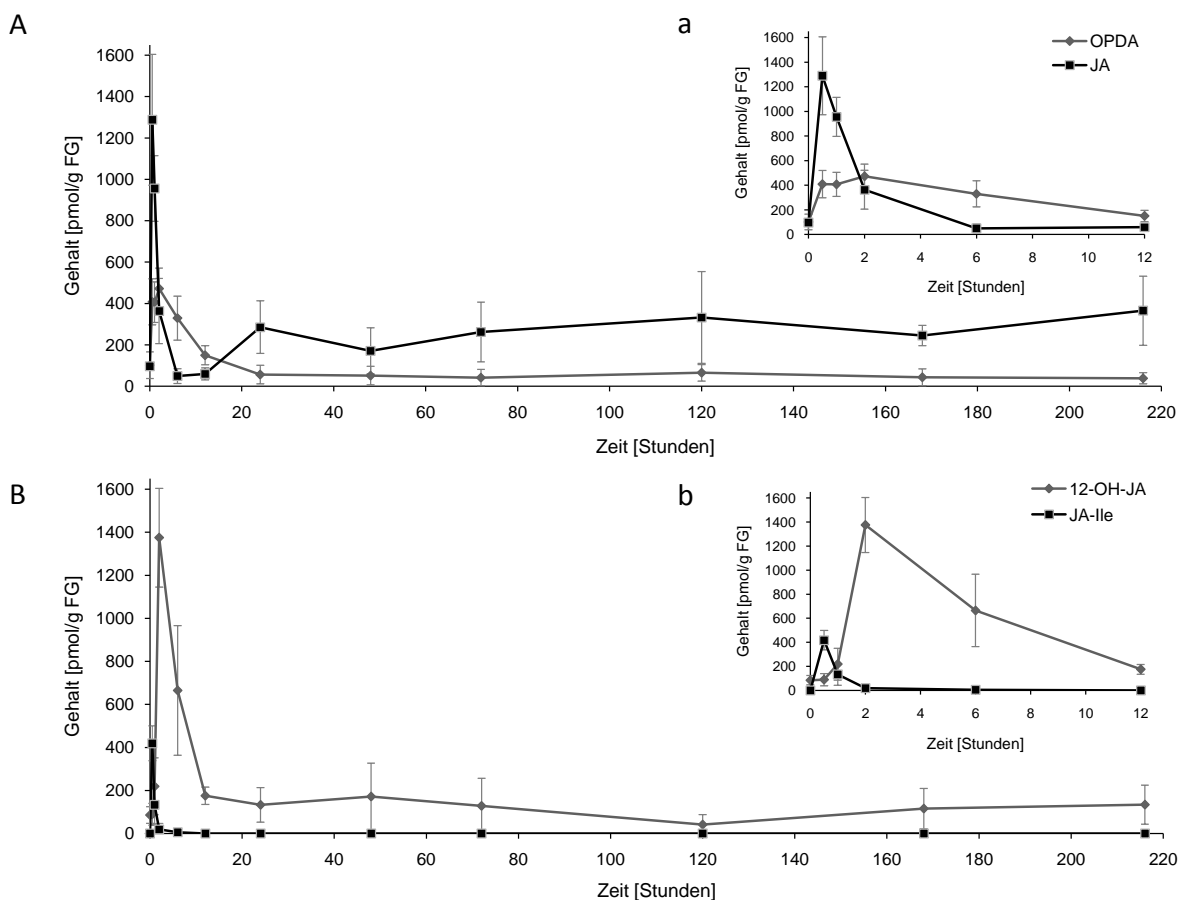


Abbildung 3-4: Die Analyse der Gehalte von **A, a** OPDA und JA sowie **B, b** JA-Ile und 12-OH-JA während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen. Die Gehalte wurden, wie unter 2.9.8 beschrieben, bestimmt. Die mit Großbuchstaben gekennzeichneten Graphiken stellen den gesamten Prozess der Stecklingsbewurzelung dar, während die mit Kleinbuchstaben gekennzeichneten Graphiken die ersten zwölf Stunden nach Stecklingernte abbilden. Die berechneten Mittelwerte von drei biologischen Replikaten und die dazugehörigen Standardabweichungen sind in den Diagrammen dargestellt.

Neben OPDA und JA wurden auch die Gehalte von zwei Metaboliten der Jasmonat-Biosynthese: dem JA-Ile und der 12-OH-JA untersucht (Abbildung 3-4 B, b). Dabei wurde gezeigt, dass der Gehalt von JA-Ile ähnlich wie der von JA bereits nach 30 Minuten auf einen maximalen Wert anstieg, wobei dieser bei nur 420 pmol/g FG lag. Der Ausgangswert von 5 pmol/g FG wurde nach

zwei Stunden erreicht. Im Vergleich dazu stieg der 12-OH-JA-Gehalt erst nach einer Stunde an und erreichte ein Maximum von 1400 pmol/g FG zwei Stunden nach Stecklingsernte. Der Ausgangswert von ca. 100 pmol/g FG wurde nach zwölf Stunden erreicht (Abbildung 3-4 b). Bis zum Erscheinen erster Adventivwurzeln an der Stecklingsbasis waren keine weiteren Änderungen der JA-Ile- bzw. 12-OH-JA-Gehalte nachzuweisen (Abbildung 3-4 B).

3.1.2.2 Die Akkumulation des *PhAOC*-Transkripts und die enzymatische Aktivität der *PhAOC* während der Stecklingsbewurzelung

Der angesichts eines Verwundungsreizes verursachte Anstieg von Jasmonaten wird oft mit der Transkript-Akkumulation von Genen, die für die Jasmonat-Biosynthese-Enzyme LOX, AOS oder AOC kodieren, in Verbindung gebracht. Und auch die Applikation von Jasmonaten hat eine Akkumulation des LOX-, AOS- bzw. AOC-Transkripts zur Folge. Ob der unter Punkt 3.1.2.1 gezeigte transiente Anstieg der Jasmonate eine Wirkung auf die Expression der *PhAOC* hat, sollte im Folgenden mittels qRT-PCR untersucht werden.

Die qRT-PCR ist eine sehr empfindliche Methode, die es ermöglicht, selbst geringe Änderungen in der Expression von Genen zu quantifizieren. Die mittels qRT-PCR erhaltenen Daten können von verschiedenen Faktoren wie den Eigenschaften des Ausgangsmaterials oder der RNA-Extraktionsmethode stark beeinflusst sein. Deshalb ist eine Normalisierung der Daten mit Hilfe eines Referenz-Gens angeraten. Die Expression der hierfür normalerweise verwendeten Gene kann jedoch unter verschiedenen experimentellen Bedingungen beträchtlichen Schwankungen unterliegen (Czechowski *et al.*, 2005; Nicot *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2006; Exposito-Rodriguez *et al.*, 2008; Garg *et al.*, 2010; Mallona *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurden zunächst sechs üblicherweise verwendete Referenz-Gene [*Actin*, *Cyclophilin*, *Elongationsfaktor 1 α* (*EF1 α*), *Tubulin*, *Polyubiquitin*, *Ribosomales Protein S13 (RPS13)*] auf eine möglichst gleichbleibende Expression während der Bewurzelung von Stecklingen hin untersucht. Es zeigte sich, dass die Transkript-Akkumulation von *Actin*, *Cyclophilin*, *Tubulin* und *Polyubiquitin* während der Bewurzelung stärkeren Schwankungen unterlag (Anhang, Abbildung 6-3). Die ermittelten Ct-Werte einzelner Gene lagen dabei bis zu zwei Zyklen auseinander. Aufgrund der relativ gleichbleibenden Transkript-Akkumulation während der Bewurzelung erfolgte die Normalisierung der qRT-PCR Daten in allen folgenden Untersuchungen mit Hilfe des *RPS13* Gens.

Im Anschluss an diese Voruntersuchung wurden die *PhAOC* Expression auf mögliche Änderungen während der Stecklingsbewurzelung hin untersucht. Auf Abbildung 3-5 a ist zu erkennen, dass die *PhAOC* Transkript-Akkumulation 0,5 Stunden nach Stecklingsernte anstieg und nach einer Stunde einen Maximalwert erreichte. Nach sechs Stunden war nur noch wenig *PhAOC* Transkript nachweisbar. Bis zum Erscheinen erster Adventivwurzeln waren keine weiteren Änderungen der *PhAOC* Transkript-Akkumulation nachzuweisen (Abbildung 3-5 A). Der transiente Anstieg in der *PhAOC* Transkript-Akkumulation hatte jedoch keinen Einfluss auf das Protein. Sowohl die in pflanzlichen Proteinrohextrakten enthaltene enzymatische Aktivität der *PhAOC* (Abbildung 3-5 B) als auch das mit Hilfe des anti-SIAOC Antikörpers detektierte Protein (Anhang, Abbildung 6-4) blieben während des gesamten Bewurzelungsprozesses unverändert.

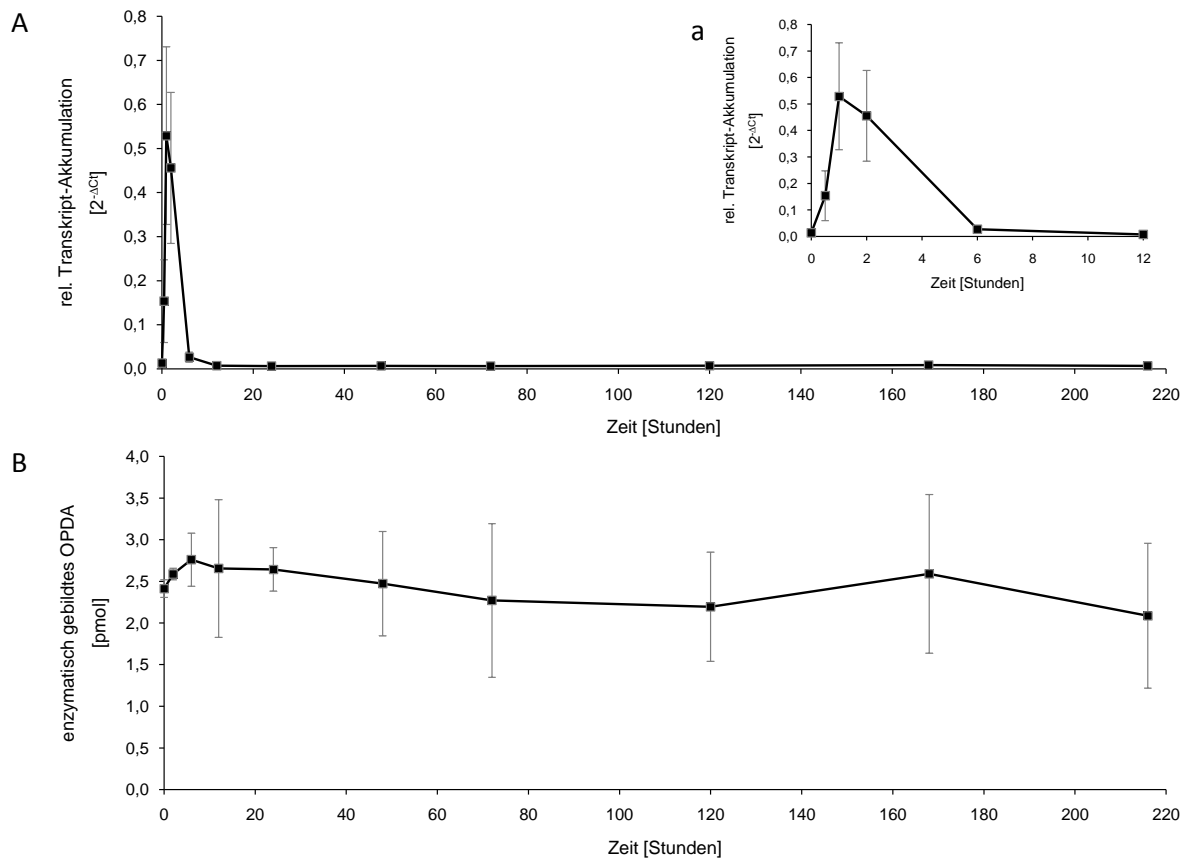


Abbildung 3-5: **A, a** Die Transkript-Akkumulation des *PhAOC*-Gens (siehe 2.5.2.8) und **B** die enzymatische Aktivität der *PhAOC* (siehe 2.9.7) während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen. Die mit Großbuchstaben gekennzeichneten Graphiken stellen den gesamten Prozess der Stecklingsbewurzelung dar, während die mit Kleinbuchstaben gekennzeichneten Graphiken die ersten zwölf Stunden nach Stecklingsernte abbilden. Als Ausgangsmaterial für **A** wurde von je drei Stecklingen vereinigt Stängelmaterial verwendet. Für die Berechnung der relativen Transkript-Akkumulation diente *RPS13* als Referenz-Gen. Für **B** fanden Proteinrohextrakte aus *Petunia* Verwendung, wobei 35 μg Protein eingesetzt wurden (siehe 2.9.1). Die berechneten Mittelwerte von drei biologischen Replikaten und die dazugehörigen Standardabweichungen sind in den Diagrammen dargestellt.

3.1.2.3 Die Lokalisierung der AOC in *Petunia*-Stecklingen

Wie unter 3.1.2.2 dargestellt, hat die transiente Akkumulation des *PhAOC* Transkripts keinen nachweisbaren Einfluss auf das *PhAOC* Protein. Das unveränderte Proteinvorkommen schließt jedoch eine Änderung in der lokalen Verteilung der *PhAOC* während des Bewurzelungsprozesses nicht aus. Deshalb wurden von Stängelmaterial, welches 0, 24, 48, 72, 120, 168 sowie 216 Stunden nach Stecklingsernte fixiert und in PEG eingebettet wurde, Dünnschnitte angefertigt. Die Stängelquerschnitte wurden mit dem anti-SIAOC Antikörper oder mit Präimmunserum (Kontrolle) behandelt. Die vom sekundären Antikörper resultierende Fluoreszenz (grüne Markierung) ermöglichte die Detektion des durch das Protein spezifisch gebundenen primären Antikörpers. Zusätzlich erfolgte eine Färbung der in den Zellkernen enthaltenen DNA mittels DAPI (blaue Markierung; siehe auch 2.10.2).

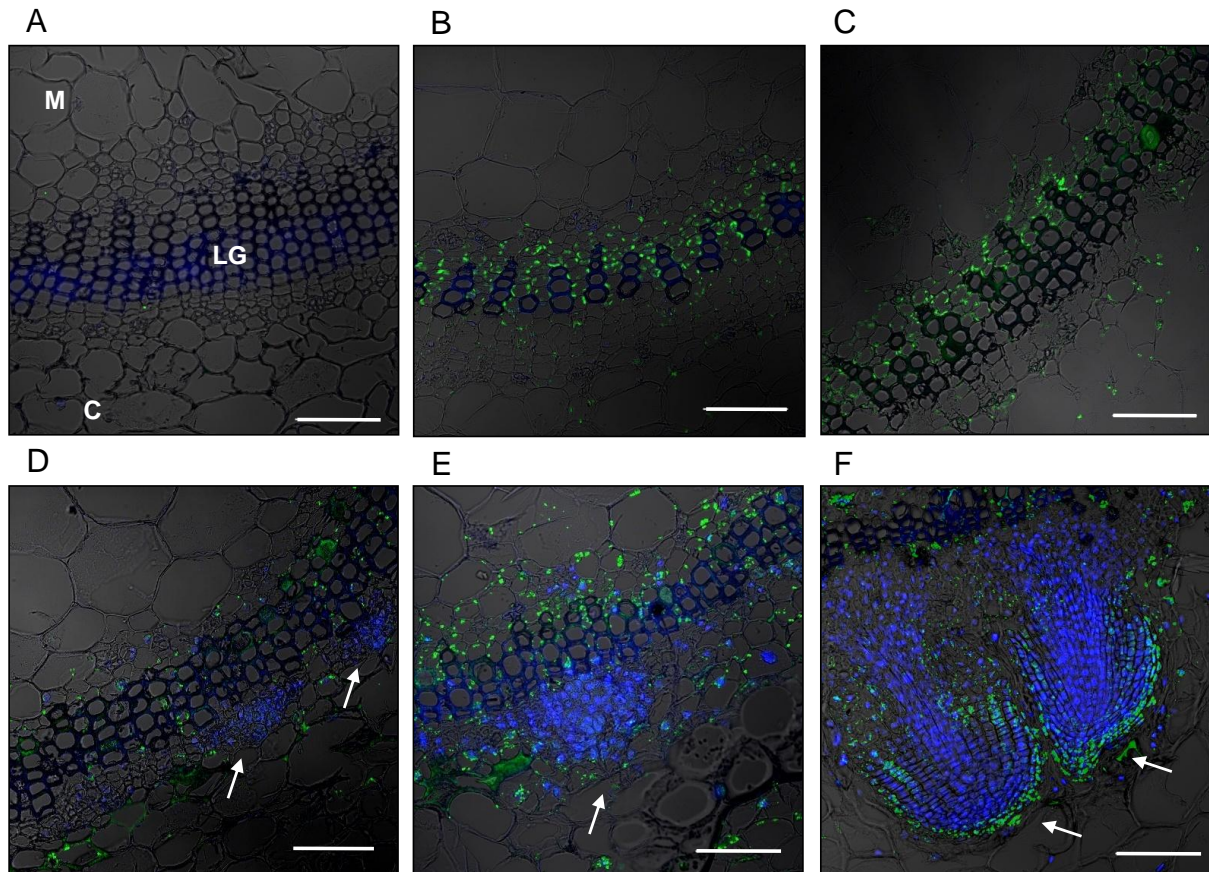


Abbildung 3-6: Lokalisierung der PhAOC in Stängelquerschnitten von *Petunia*-Stecklingen während der Bewurzelung. **A** 0 Stunden (Präimmunserum) sowie **B** 0 Stunden, **C** 48 Stunden, **D** 72 Stunden **E** 168 Stunden und **F** 216 Stunden (anti-SIAOC Antikörper) nach Ernte der Stecklinge. Sekundärer Antikörper konjugiert mit AlexaFluor488: grüne Markierung, DAPI-Färbung: blaue Markierung. **M** Mark, **LG** Leitgewebe, **C** Cortex. Mit Pfeilen sind meristematisches Gewebe (**D**), Primordien (**E**) und Adventivwurzeln (**F**) angezeigt. Maßstab: 100 μ m.

Mit Hilfe der DAPI-Färbung war es möglich nachzuweisen, dass bis 48 Stunden nach Ernte der Stecklinge keine morphologischen Veränderungen in den Stängelquerschnitten auftraten (Abbildung 3-6 B und C) Die Ausbildung meristematischen Gewebes setzte 72 Stunden nach Stecklingsernte ein und war anhand des gehäuften Auftretens von Zellkernen gut zu erkennen (Abbildung 3-6 D). Das Wachstum und die Differenzierung meristematischer Zellen führten über das Stadium der Primordien (168 Stunden, Abbildung 3-6 E) zur Ausbildung von Adventivwurzeln (216 Stunden, Abbildung 3-6 F).

Neben den verschiedenen Stadien der Adventivwurzelentwicklung waren auch Aussagen in Bezug auf die Lokalisierung der PhAOC im Stängelquerschnitt möglich. In den mit dem Präimmunserum behandelten Schnitten konnte keine Fluoreszenz detektiert werden (Abbildung 3-6 A). Im Vergleich dazu waren nach Inkubation mit dem anti-SIAOC Antikörper Fluoreszenz-Signale nachzuweisen (Abbildung 3-6 B bis F). Aufgrund dieser Ergebnisse kann von einer spezifischen Erkennung der PhAOC durch den anti-SIAOC Antikörper ausgegangen werden. Die detektierte Fluoreszenz konzentrierte sich überwiegend in den Plastiden des Leitgewebes (Abbildung 3-6 B bis E). Dies würde die mittels *ChloroP 1.1*-Software vorhergesagte Lokalisierung

rung der PhAOC in den Chloroplasten bestätigen (siehe 3.1.1.1). Der spezifische Nachweis der PhAOC im Leitgewebe war über den gesamten Zeitraum der Stecklingsbewurzelung möglich. Die Ausbildung von Meristem und Primordien hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Verteilung der PhAOC im Stängelquerschnitt (Abbildung 3-6 B bis E). Erst in den neu gebildeten Adventivwurzeln waren zusätzliche Fluoreszenz-Signale in den Wurzelspitzen detektierbar (Abbildung 3-6 F).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass direkt nach der Stecklingsernte sowohl die Jasmonate als auch das *PhAOC*-Transkript transient akkumulieren. Dies hat keinen Einfluss auf das Vorkommen und die enzymatische Aktivität der PhAOC. Während der Bewurzelung ändert sich nur die lokale Verteilung des Proteins. Ein spezifischer Nachweis der in den Plastiden lokalisierten PhAOC ist über den gesamten Zeitraum der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen im Leitgewebe und nach Ausbildung der Adventivwurzeln zusätzlich in den Spitzen neu gebildeter Wurzeln möglich.

3.2 Die Akkumulation von Auxin- bzw. Ethylen während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen

Es ist hinreichend beschrieben, dass sowohl Auxin als auch Ethylen die Entwicklung von Adventivwurzeln beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die Auxin- und Ethylen-Gehalte sowie die Transkript-Akkumulation Auxin- und Ethylen-induzierbarer Gene auf mögliche Änderungen während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen hin untersucht.

Der Auxin-Gehalt wird durch eine Anzahl metabolischer Prozesse beeinflusst, sodass neben der freien IAA auch verschiedene IAA-Konjugate und strukturverwandte Verbindungen in der Pflanze vorkommen. Abgesehen von IBA und 4-Chloroindol-3-essigsäure wird nur für die freie IAA eine biologische Wirksamkeit beschrieben (Woodward und Bartel, 2005). Im Folgenden wurden ausschließlich die Gehalte der freien IAA in den *Petunia*-Stecklingen bestimmt.

Der Gehalt an freier IAA stieg während der Stecklingsbewurzelung zweimal transient an (Abbildung 3-7 A und a). Ein erster Maximalwert (109 pmol/g FG; Abbildung 3-7 a) wurde zwei Stunden und ein zweiter (100 pmol/g FG; Abbildung 3-7 A) 24 Stunden nach Ernte der Stecklinge nachgewiesen. 72 Stunden nach Stecklingsernte fiel der Gehalt an freier IAA auf ein Minimum von 40 pmol/g FG ab und verblieb bis zum Sichtbarwerden der ersten Adventivwurzeln auf diesem Niveau (Abbildung 3-7 A).

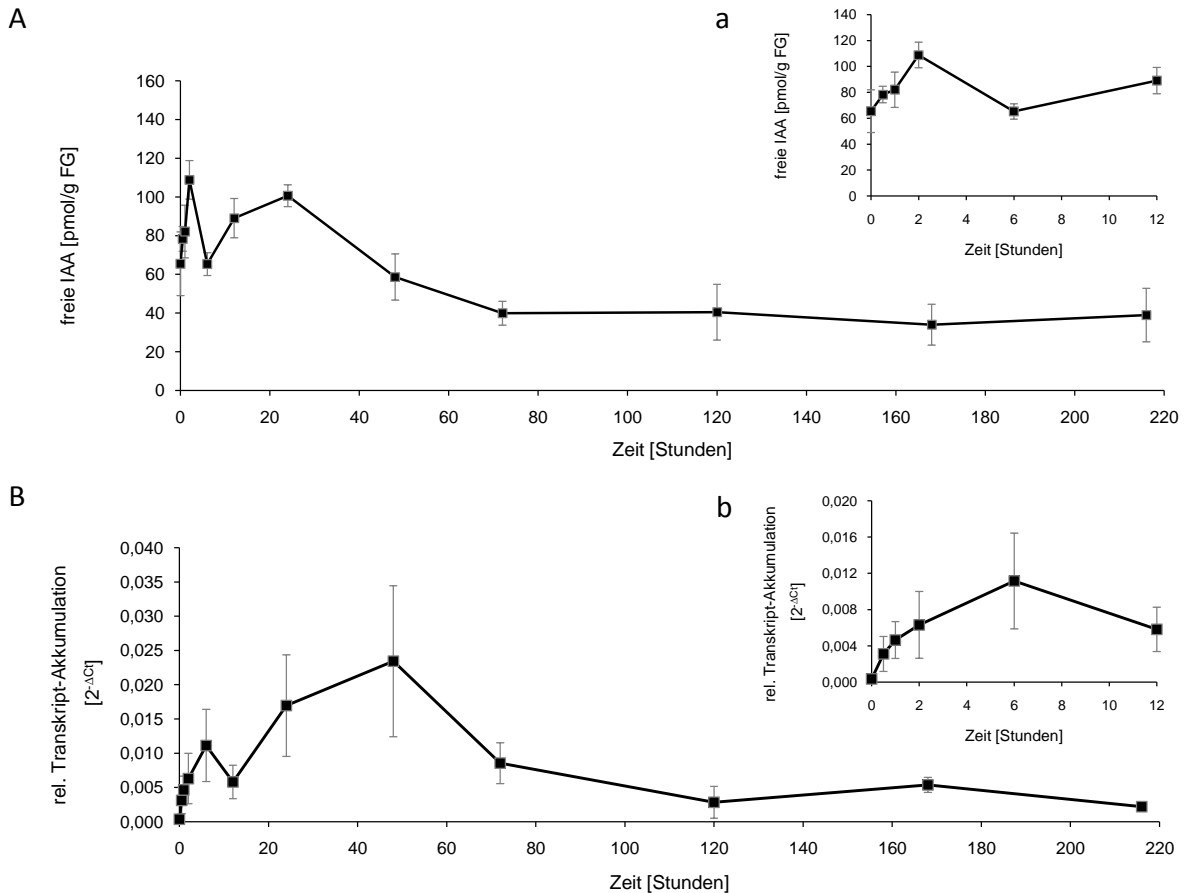


Abbildung 3-7:**A, a** Der Gehalt der freien IAA (siehe 2.9.9) und **B, b** die *DevA-20-C01*-Transkript-Akkumulation (CV296522, siehe 2.5.2.8) während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen. Die mit Großbuchstaben gekennzeichneten Graphiken stellen den gesamten Prozess der Stecklingsbewurzelung dar, während die mit Kleinbuchstaben gekennzeichneten Graphiken die ersten zwölf Stunden nach Stecklingsernte abbilden. Als Ausgangsmaterial für **B** bzw. **b** fanden von je drei Stecklingen vereinigt Stängelmaterial Verwendung. Für die Berechnung der relativen Transkript-Akkumulation diente *RPS13* als Referenz-Gen. Die berechneten Mittelwerte von drei biologischen Replikaten und die dazugehörigen Standardabweichungen sind in den Diagrammen dargestellt.

Ob die Expression Auxin-induzierbarer Gene infolge der transienten Akkumulation der freien IAA beeinflusst wird, sollte ebenfalls untersucht werden. In der Literatur sind drei Gruppen Auxin-induzierbarer Gene beschrieben: *Aux/IAAs* (*Auxin/Indole-3-Acetic Acid*), *SAURs* (*Small Auxin-Up RNA*) und *GH3s* (Hagen und Guilfoyle, 2002). Für die der *GH3*-Gruppe zugehörigen Gene ist bekannt, dass infolge einer Applikation von Auxin das entsprechende Transkript innerhalb kürzester Zeit akkumuliert (Hagen und Guilfoyle, 1985; Roux und Perrot-Rechenmann, 1997; Calderon-Villalobos *et al.*, 2006). Für das Modellsystem *Petunia* ist noch kein der *GH3*-Gruppe zugehöriges Gen identifiziert. Deshalb wurden die für die qRT-PCR Analyse benötigten spezifischen Oligonukleotide von einer zur Verfügung stehenden EST-Sequenz aus *Petunia hybrida* (CV296522; *DevA-20-C01*) abgeleitet, wobei die verwendete EST-Sequenz große Ähnlichkeit zu einem der *GH3*-Familie zugehörigen Gen *aus Glycine max* (BE211751, 69 %, Hagen und Guilfoyle, 1985) bzw. *Nicotiana tabacum* (AF123503, 71 %, Roux und Perrot-Rechenmann, 1997) aufwies.

Wie in Abbildung 3-7 B bzw. b dargestellt, akkumulierte das *DevA-20-C01*-Transkript zu zwei Zeiten: sechs (Abbildung 3-7 b) und 48 Stunden nach Stecklingsernte (Abbildung 3-7 B) und war somit den Anstiegen der freien IAA zeitlich nachgelagert. Dabei fiel die Transkriptmenge des zweiten Anstiegs ungefähr doppelt so hoch aus wie die des ersten Anstiegs. Bis zum Erscheinen erster Adventivwurzeln an der Stecklingsbasis waren keine weiteren Änderungen in der Transkript-Akkumulation nachzuweisen (Abbildung 3-7 B).

Im Weiteren wurde auch die Ethylen-Biosynthese auf mögliche Änderungen während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen hin untersucht. Die Bildung von Ethylen verläuft ausgehend von L-Methionin über S-Adenosyl-L-methionin und ACC. Die Umsetzung von S-Adenosyl-L-methionin zu ACC wird durch die ACC-Synthase (ACS) katalysiert, wobei dies als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Ethylen-Biosynthese angesehen wird (Cameron *et al.*, 1979). Die Umwandlung von ACC und somit die Freisetzung von Ethylen erfolgt mit Hilfe der ACC-Oxidase (ACO) (Bleecker und Kende, 2000). In einer Reihe unterschiedlicher physiologischer Ansätze konnte man nachweisen, dass Änderungen im ACC-Gehalt und in der Ethylen-Freisetzung synchron auftreten (Bufler *et al.*, 1980; Apelbaum und Yang, 1981; Riov und Yang, 1982; Belles *et al.*, 1989; Hong *et al.*, 2004). Gemäß dieser Tatsache wurden im Rahmen dieser Arbeit die Gehalte der Ethylen-Vorstufe ACC ermittelt und auf eine Quantifizierung des synthetisierten und freigesetzten Ethylens verzichtet.

Die während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen gemessenen Gehalte von ACC sind in Abbildung 3-8 A bzw. a dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der ACC-Gehalt 24 Stunden nach Stecklingsernte einen maximalen Wert von 4400 pmol/g FG annahm (Abbildung 3-8 A). Der Ausgangswert von ca. 50 pmol/g FG wurde 72 Stunden nach Stecklingsernte erreicht und änderte sich nicht mehr bis zum Sichtbarwerden der ersten Adventivwurzeln.

Ebenfalls untersucht wurde, ob sich die Expression Ethylen-induzierbarer Gene während der Stecklingsbewurzelung ändert. Für verschiedene Pflanzen-Spezies ist nachgewiesen, dass Ethylen die Expression der für die ACS bzw. ACO kodierenden Gene induziert (Woodson *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 1994; Bouquin *et al.*, 1997; Bui und Neill, 1998). Im Folgenden wurde die ACO-Expression auf Änderungen während der Stecklingsbewurzelung hin untersucht. In *Petunia* wird die ACO durch eine kleine Genfamilie von vier Genen kodiert (Tang *et al.*, 1993), deren kodierende Sequenzen untereinander große Ähnlichkeiten aufweisen. Die für die qRT-PCR verwendeten spezifischen Oligonukleotide wurden von der Nukleotid-Sequenz des *PhACO1* Gens (L21976) abgeleitet, weshalb nur Aussagen in Bezug auf eine veränderte Expression der *PhACO1* möglich waren.

In den *Petunia*-Stecklingen war zwei Stunden nach Ernte eine erhöhte *ACO1* Transkript-Akkumulation nachzuweisen. Zu diesem Zeitpunkt akkumulierte das *ACO1* Transkript jedoch nur geringfügig (Abbildung 3-8 B bzw. b). Ein zweiter Maximalwert wurde 72 Stunden nach der Stecklingsernte erreicht, wobei dieser im Vergleich zum ersten dreifach höher ausfiel. Bis zum Erscheinen erster Adventivwurzeln sank die *ACO1* Transkript-Akkumulation ab, erreichte jedoch nicht den Ausgangswert (Abbildung 3-8 B).

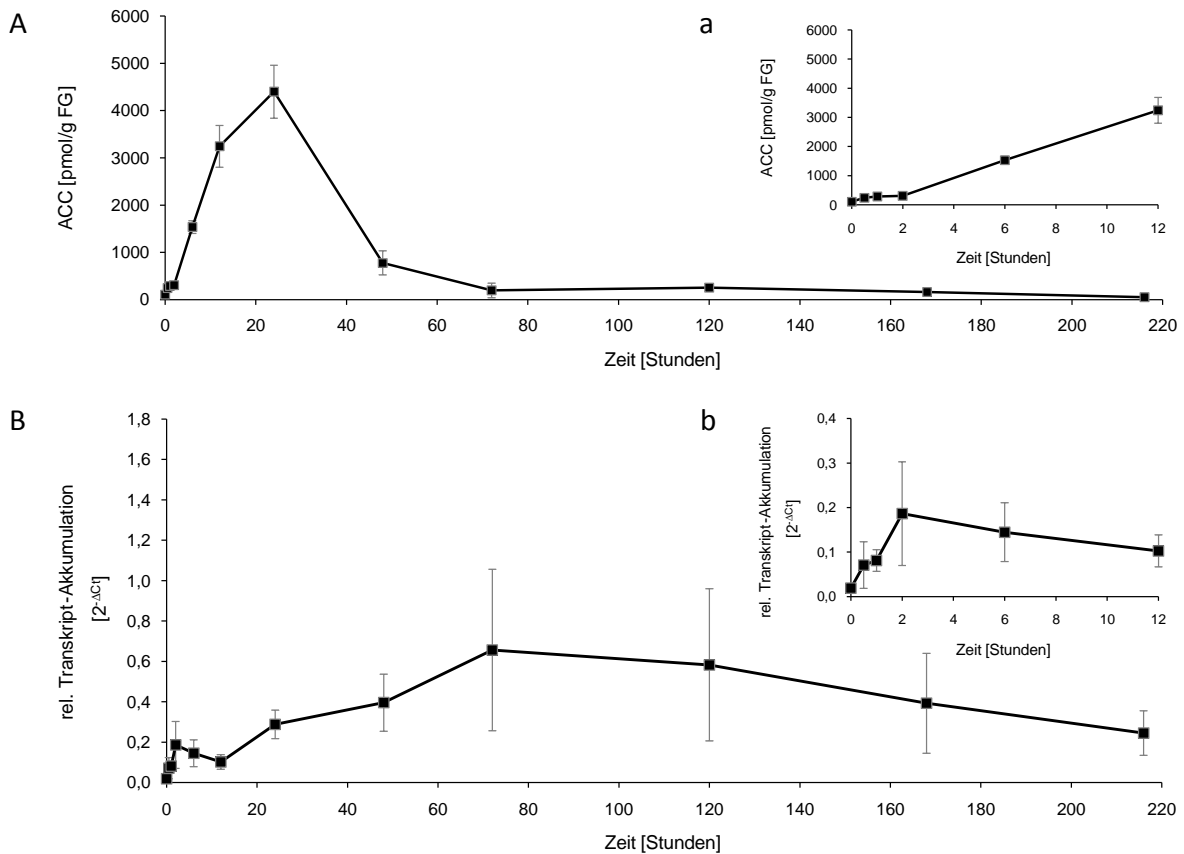


Abbildung 3-8: **A, a** Die ACC-Gehalte (siehe 2.9.9) und **B, b** die Transkript-Akkumulation des *PhACO1* Gens (L21976, siehe 2.5.2.8) während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen. Die mit Großbuchstaben gekennzeichneten Graphiken stellen den gesamten Prozess der Stecklingsbewurzelung dar, während die mit Kleinbuchstaben gekennzeichneten Graphiken die ersten zwölf Stunden nach Stecklingsernte abbilden. Als Ausgangsmaterial für **B** bzw. **b** fanden von je drei Stecklingen vereinigt Stängelmaterial Verwendung. Für die Berechnung der relativen Transkript-Akkumulation diente *RPS13* als Referenz-Gen. Die berechneten Mittelwerte von drei biologischen Replikaten und die dazugehörigen Standardabweichungen sind in den Diagrammen dargestellt.

Mit Hilfe der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurde gezeigt, dass sowohl die Gehalte der freien IAA als auch die von ACC innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Ernte der *Petunia*-Stecklinge transient ansteigen. Die Maxima der untersuchten Auxin- bzw. Ethylen-induzierbaren Gene waren denen der IAA- bzw. ACC-Gehalte zeitlich nachgelagert.

3.3 Der Einfluss von Jasmonaten auf die Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen

In den Abschnitten 3.1.2.1 und 3.2 wurde nachgewiesen, dass sowohl die Gehalte der Jasmonate als auch die der freien IAA und der ACC innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Stecklingsernte transient akkumulieren. Diese relativ zeitnahe Akkumulation aller drei Phytohormone könnte auf mögliche Interaktionen zwischen Jasmonaten, Auxin und Ethylen hindeuten. Wie bereits erwähnt, beeinflussen neben anderen Wachstumsfaktoren vor allem Auxin und Ethylen die Entwicklung von Adventivwurzeln. Die Wirkung beider Phytohormone lässt sich dabei auf bestehen-

de Wechselwirkungen zwischen Auxin und Ethylen zurückführen. Hinsichtlich eines möglichen Einflusses der Jasmonate auf die Ausbildung von Adventivwurzeln liegen bisher kaum Erkenntnisse vor. Dementsprechend ergab sich die folgende Fragestellung:

Beeinflusst die transiente Akkumulation von Jasmonaten generell die Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen und liegt diesbezüglich ein interaktiver Wirkmechanismus zu Auxin bzw. Ethylen vor?

Für die Beantwortung der Frage wurden zwei verschiedenartige Ansätze gewählt. Zum einen wurden pharmakologische Experimente durchgeführt. Diese hatten zum Ziel, eine mögliche Wirkung exogen verabreichter Jasmonate auf die Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen nachzuweisen und mögliche synergistische bzw. antagonistische Effekte durch eine kombinierte Gabe von Jasmonat und Ethylen bzw. Jasmonat und Auxin aufzuzeigen.

Ferner wurde in einem zweiten Lösungsansatz untersucht, ob die Ausbildung von Adventivwurzeln in *Petunia*-Stecklingen infolge einer modulierten Jasmonat-Biosynthese beeinflusst wird. Hierfür sollten die Jasmonat-Gehalte in *Petunia* über das Jasmonat-Biosynthese-Enzym AOC mit Hilfe von AOC-sense-Pflanzen erhöht bzw. mit Hilfe von *PhAOC*-Insertionsmutanten und *PhAOC-RNAi*-Pflanzen reduziert werden.

3.3.1 Die Wirkung exogen verabreichter Jasmonate auf den Bewurzelungsprozess

Die pharmakologischen Experimente erfolgten wie unter 2.4 beschrieben. Es wurden zunächst die Wurzeln von zwei Wochen alten Pflanzen vollständig entfernt. Anschließend erfolgte der Transfer der Stecklinge auf MS-Medium, wobei das Medium die zu applizierenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen enthielt. Für jedes durchgeführte Experiment dienten Stecklinge, die auf MS-Medium ohne weiteren Zusatz bewurzelt wurden, als Kontrolle. Nach zwei Wochen wurden pro Steckling sowohl die durchschnittliche Wurzellänge als auch die Anzahl der ausgebildeten Adventivwurzeln bestimmt.

Die Applikation von Jasmonaten

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob eine JA-Applikation die Bewurzelung der *Petunia*-Stecklinge beeinflusst. Neben der JA wurde aber auch die Wirkung von OPDA, dem biologisch aktiven Intermediat der Jasmonat-Biosynthese sowie die zweier JA-Metabolite: JA-Ile und 12-OH-JA untersucht, wobei von den aufgeführten Substanzen jeweils verschiedene Konzentrationen getestet wurden. Die Anzahl der neu gebildeten Adventivwurzeln nahm infolge einer JA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ab (Abbildung 3-9 A). So reduzierte sich die Wurzelanzahl nach Applikation von 10 μM JA um 46 % und ab einer JA-Konzentration von 100 μM bildeten sich keine Adventivwurzeln mehr aus. Die Anzahl der neu gebildeten Wurzeln pro Steckling reduzierte sich ebenfalls infolge einer Behandlung mit OPDA und JA-Ile (Abbildung 3-10 A). Nach Gabe von 10 bzw. 100 μM OPDA nahm die Wurzelanzahl um 25 % bzw. 50 % ab und eine Applikation von 10 bzw. 100 μM JA-Ile hatte eine Reduktion um 25 % bzw. 68 % zur Folge. Im Vergleich dazu

war erst nach Gabe von 100 μM 12-OH-JA eine um 33 % verminderte Wurzelanzahl nachzuweisen (Abbildung 3-10 A).

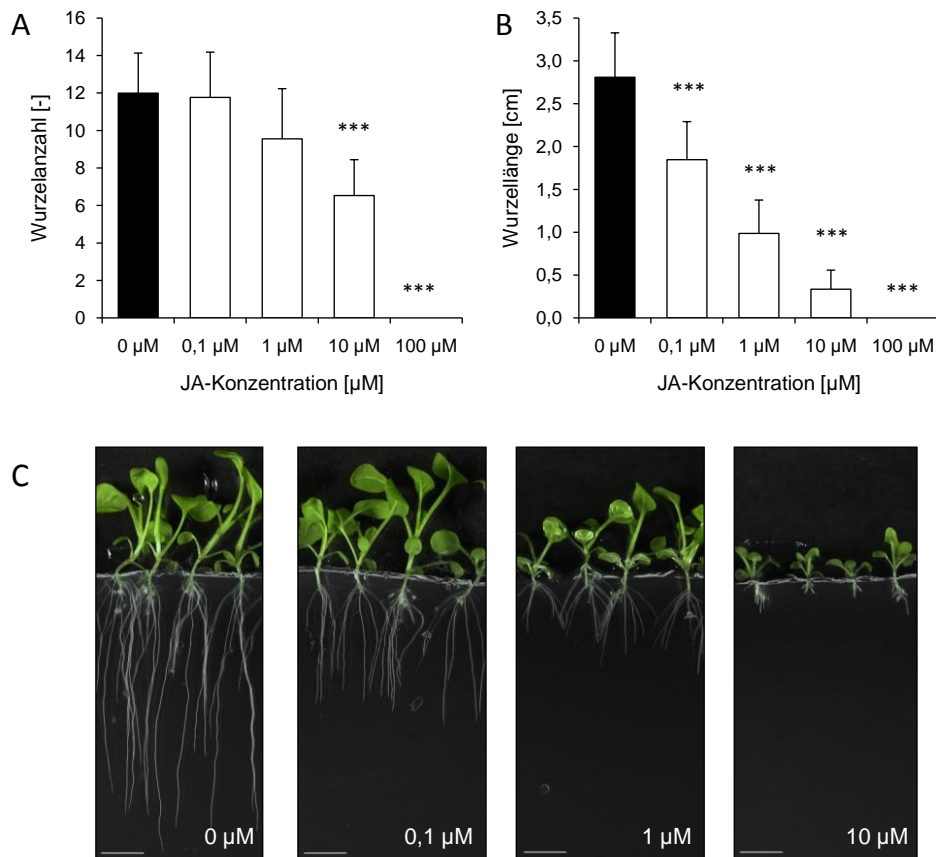


Abbildung 3-9: Die konzentrationsabhängige Wirkung von JA auf **A** die Wurzelanzahl sowie **B** die durchschnittliche Wurzellänge. **C** Stellt eine Übersichtsaufnahme der bewurzelten Steckling dar (Maßstab: 1 cm). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte ($n=10$) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (***) $p < 0,001$).

Weiterhin ist zu erkennen, dass die Applikation von JA die durchschnittliche Länge der neu gebildeten Adventivwurzeln reduzierte (Abbildung 3-9 B und C). Die Verminderung der Wurzellänge war dabei von der applizierten JA-Menge abhängig. Bereits bei einer JA-Konzentration von 0,1 μM nahm die durchschnittliche Wurzellänge im Vergleich zur Kontrolle um 40 % ab und nach Gabe von 10 μM JA war eine Reduktion um 90 % nachzuweisen (Abbildung 3-9 B). Eine Applikation von OPDA, JA-Ile bzw. 12-OH-JA lieferte ähnliche Ergebnisse, wobei eine verminderte durchschnittliche Wurzellänge erst nach Gabe von 100 μM 12-OH-JA nachzuweisen war (Abbildung 3-10 B).

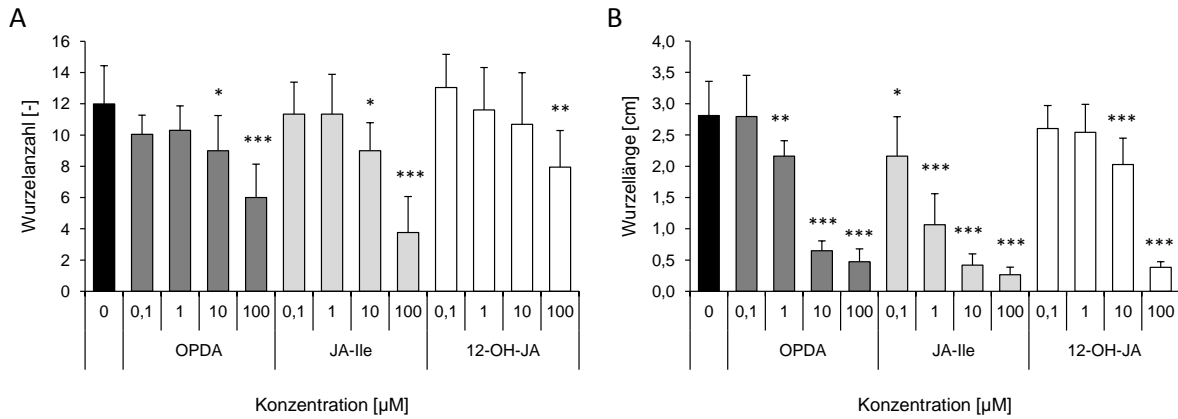


Abbildung 3-10: Die konzentrationsabhängige Wirkung von OPDA, JA-Ile bzw. 12-OH-JA auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (n=10) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Die gleichzeitige Applikation von Auxin und JA

Neben einer Wirkung von Jasmonaten auf die Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen sollten auch mögliche synergistische bzw. antagonistische Effekte aufgezeigt werden, die in Reaktion auf eine kombinierte Gabe von Jasmonat und Auxin auftreten. Hierfür war es zunächst erforderlich, die Wirkung einer alleinigen Gabe von synthetischen (2,4-D) und natürlich vorkommenden Auxinen (IAA und IBA) zu untersuchen. Von den entsprechenden Substanzen wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Aufgrund der Übersichtlichkeit werden im Folgenden nur die Ergebnisse des für das Kombinationsexperiment ausgewählten Auxins abgebildet. Die Ergebnisse aller anderen getesteten Substanzen sind im Anhang unter Punkt 6.3 aufgeführt.

Die Anzahl der neu gebildeten Adventivwurzeln stieg nach Applikation von 2,4-D in Abhängigkeit von der Konzentration an (Abbildung 3-11 A). Bei einer 2,4-D-Konzentration von 0,1 µM nahm die Wurzelanzahl im Vergleich zur Kontrolle um 10 % und nach Gabe von 1 µM 2,4-D um 60 % zu. Anders verhielt es sich in Bezug auf die durchschnittliche Länge der regenerierten Adventivwurzeln. So hatte eine Behandlung von *Petunia*-Stecklingen mit 2,4-D zur Folge, dass sich die durchschnittliche Wurzellänge in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration reduzierte (Abbildung 3-11 B). Durch eine Applikation von 0,1 µM 2,4-D nahm die durchschnittliche Wurzellänge im Vergleich zur Kontrolle um 20 % ab und nach Gabe von 1 µM 2,4-D war eine Reduktion um 60 % nachzuweisen. Eine Behandlung der Stecklinge mit den natürlich vorkommenden Auxinen IAA bzw. IBA ergab in Bezug auf Wurzelanzahl sowie durchschnittliche Wurzellänge ähnliche Ergebnisse (Anhang, Abbildung 6-5 A und B).

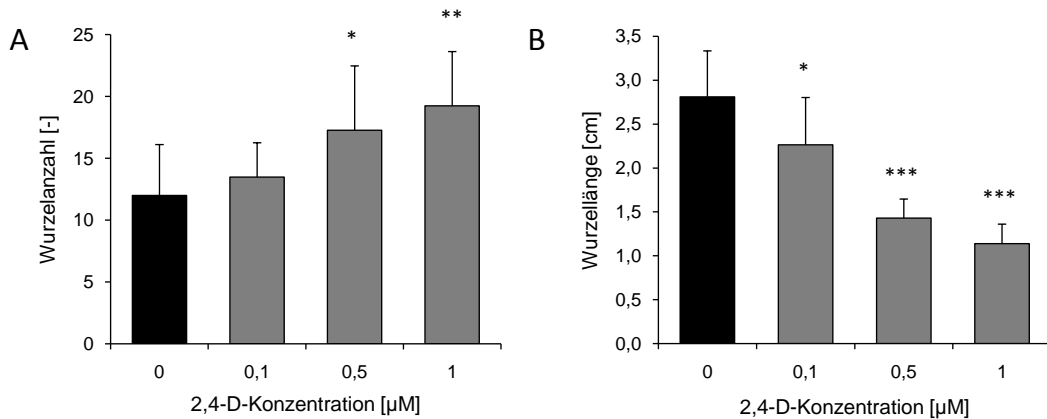


Abbildung 3-11: Die konzentrationsabhängige Wirkung von 2,4-D auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte ($n=10$) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Es ist bekannt, dass die Auxine IBA und insbesondere IAA in gelöster Form unzureichende Stabilität aufweisen und innerhalb weniger Tage nur noch geringe Mengen der Substanzen im Medium nachzuweisen sind (Nordström *et al.*, 1991). Um für die Kombinationsexperimente während der gesamten Applikationsdauer eine konstante Auxin-Konzentration zu gewährleisten, wurde JA im folgenden Experiment zusammen mit dem synthetisch hergestellten Auxin 2,4-D appliziert. Beide Substanzen wurden in Konzentrationen eingesetzt, die nur eine mäßige Wirkung in Bezug auf Wurzelanzahl sowie Wurzellänge zeigten. Dies sollte bei einer möglichen interagierenden Wirkung von JA und 2,4-D eine Auswertung der Daten gewährleisten.

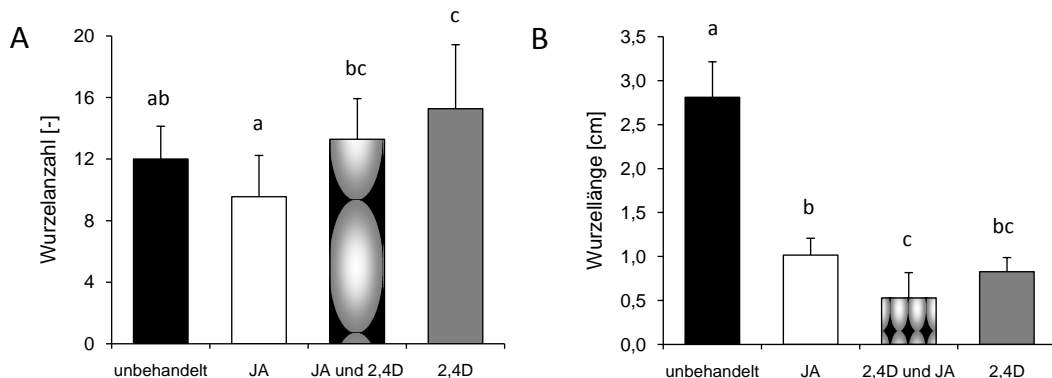


Abbildung 3-12: Die Wirkung der gleichzeitigen Applikation von 2,4-D ($0,5 \mu\text{M}$) und JA ($1 \mu\text{M}$) auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte ($n=10$) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Die Anzahl der neugebildeten Wurzeln verringerte sich nach Applikation von JA im Vergleich zur Kontrolle tendenziell (Abbildung 3-12 A). Dieser Effekt wurde durch eine gleichzeitige Applikation von JA und 2,4-D aufgehoben, wobei die zusätzliche Gabe von 2,4-D einen Anstieg um 38 % bewirkte (bezogen auf die mit JA behandelten Stecklinge). Eine Behandlung nur mit 2,4-D hatte im Vergleich zur Kontrolle einen Anstieg der Wurzelanzahl um ca. 30 % zur Folge. Dieser durch die 2,4-D-Applikation bedingte Anstieg wurde nach gleichzeitiger Gabe von JA und 2,4-D geringfügig reduziert. Weiterhin ist zu erkennen, dass die alleinige Applikation von JA eine Verminderung der durchschnittlichen Wurzellänge um 64 % zur Folge hatte (Abbildung 3-12 B). Durch eine gleichzeitige Gabe von JA und 2,4-D wurde dieser Effekt verstärkt. Die durchschnittliche Wurzellänge pro Steckling reduzierte sich im Vergleich zur Kontrolle um weitere 18 % (insgesamt um 82 %). Die Behandlung der Stecklinge nur mit 2,4-D bewirkte ebenfalls eine Verringerung der durchschnittlichen Wurzellänge und zwar um 71 %. Die gleichzeitige Applikation von JA und 2,4-D hatte keinen weiteren Einfluss auf die infolge der 2,4-D-Behandlung hervorgerufene Abnahme der durchschnittlichen Wurzellänge.

Die gleichzeitige Applikation einer Ethylen-freisetzenden Substanz und JA

Wie sich eine kombinierte Gabe von Jasmonat und Ethylen-freisetzenden Substanzen auf die Bewurzelung der *Petunia*-Stecklinge auswirkt, wurde im nächsten Experiment untersucht. Für ACC und Ethephon ist nachgewiesen, dass deren Applikation eine vermehrte Freisetzung von Ethylen im Pflanzengewebe zur Folge hat (Mudge und Swanson, 1978; Liu *et al.*, 1990; Nordström und Eliasson, 1993). Aus diesem Grund wurden verschiedene Konzentrationen von ACC bzw. Ethephon getestet, um zunächst die alleinige Wirkung einer vermehrten Ethylen-Freisetzung auf die Ausbildung von Adventivwurzeln zu untersuchen. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse der für das Kombinationsexperiment ausgewählten Ethylen-freisetzenden Substanz abgebildet. Weitere Ergebnisse sind im Anhang unter Punkt 6.3 dargestellt.

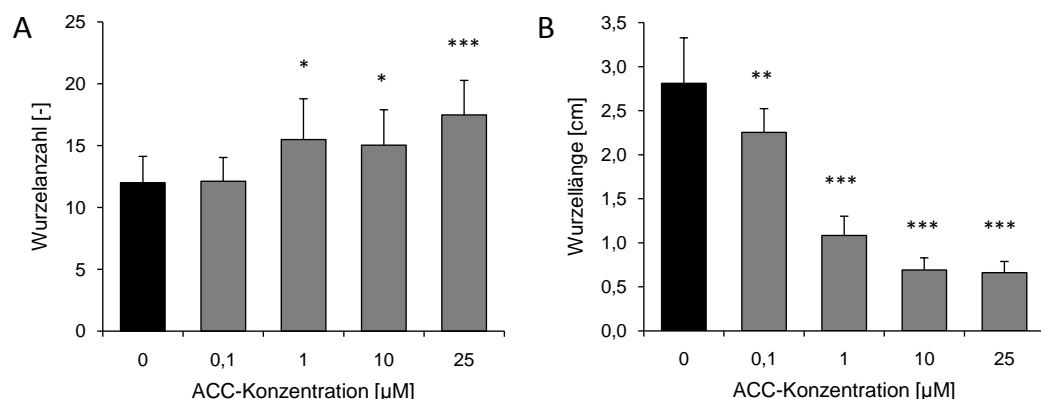


Abbildung 3-13: Die konzentrationsabhängige Wirkung von ACC auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (n=10) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Wie Abbildung 3-13 A zeigt, erhöhte sich die Wurzelanzahl mit steigender ACC-Konzentration. Durch eine Behandlung mit 1 μM ACC regenerierten im Vergleich zur Kontrolle um 25 % mehr Wurzeln und eine Gabe von 25 μM ACC hatte einen Anstieg der Wurzelanzahl um 42 % zur Folge. Im Vergleich dazu beeinflusste eine Applikation von Ethephon die Anzahl der ausgebildeten Adventivwurzeln nicht (Anhang, Abbildung 6-6 A). Überdies reduzierte ACC die durchschnittliche Wurzellänge pro Steckling in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration (Abbildung 3-13 B). Nach Gabe von 0,1 μM ACC war eine verminderte durchschnittlichen Wurzellänge um 18 % nachzuweisen und eine Applikation von 10 bzw. 25 μM ACC reduzierte die durchschnittliche Wurzellänge um 75 %. Trotzdem Ethephon die Anzahl der regenerierten Adventivwurzeln nicht beeinflusste, reduzierte es die durchschnittliche Wurzellänge in ähnlicher Weise wie ACC (Anhang, Abbildung 6-6 B).

Da Ethephon nur die Wurzellänge aber nicht die Anzahl der regenerierten Adventivwurzeln beeinflusste, wurden die *Petunia*-Stecklinge im Kombinationsexperiment mit JA und ACC behandelt. Beide Substanzen wurden in Konzentrationen eingesetzt, die nur eine mäßige Wirkung in Bezug auf Wurzelanzahl sowie durchschnittliche Wurzellänge zeigten. Dies sollte bei einer möglichen interagierenden Wirkung von JA und ACC eine Auswertung der Daten gewährleisten.

Wie bereits in Abbildung 3-12 A dargestellt, nahm die Anzahl der neugebildeten Wurzeln infolge einer JA-Behandlung tendenziell ab. Durch eine gleichzeitige Behandlung mit ACC wurde dieser Effekt aufgehoben und die Wurzelanzahl stieg in Bezug auf die mit JA-behandelten Stecklinge um 41 % an (Abbildung 3-14 A). Nach Behandlung der *Petunia*-Stecklinge nur mit ACC erhöhte sich die Anzahl der neugebildeten Wurzeln im Vergleich zur Kontrolle nur tendenziell (siehe auch Abbildung 3-13 A). Eine gleichzeitige Applikation von JA hatte keinen Einfluss auf den durch die ACC-Behandlung bedingten Anstieg der Wurzelanzahl (Abbildung 3-14 A).

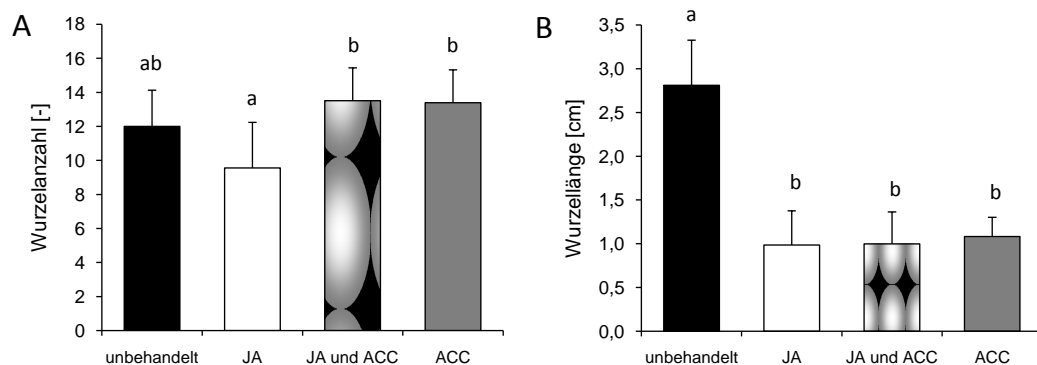


Abbildung 3-14: Die Wirkung einer gleichzeitigen Applikation von ACC (1 μM) und JA (1 μM) auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte ($n=10$) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Weiterhin ist zu erkennen, dass eine alleinige Gabe von JA eine Abnahme der durchschnittlichen Wurzellänge um 65 % bewirkte. Und auch durch eine Behandlung nur mit ACC reduzierte sich die Wurzellänge um 65 %. Eine gleichzeitige Applikation von JA und ACC hatte keinen weiteren Einfluss auf die durchschnittliche Länge der neugebildeten Adventivwurzeln (Abbildung 3-14 B).

Die gleichzeitige Applikation von Auxin-Transport- sowie Ethylen-Biosynthese-Inhibitoren und JA

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass der inhibierende Effekt der JA in Hinblick auf die Wurzelanzahl durch eine zusätzliche Gabe von ACC bzw. 2,4-D aufgehoben werden kann. Wie sich eine JA-Applikation im Falle von reduzierten Auxin- und Ethylen-Gehalten auswirkt, sollte mit Hilfe der folgenden Experimente geklärt werden. Es ist möglich den Gehalt an Ethylen über eine Inhibierung des Ethylen-Biosynthesewegs zu reduzieren. Diese Wirkung ist für AVG und Aminoxy-Essigsäure in verschiedenen Pflanzen-Spezies bereits nachgewiesen (Adams und Yang, 1979; Boller *et al.*, 1979; Yu *et al.*, 1979). Darüber hinaus gibt es Substanzen, die die Ethylen-Erkennung der Pflanze über eine kompetitive Blockierung des Ethylen-Rezeptors hemmen. Hierzu gehören unter anderem das zyklische Olefin 2,5-Norbornadien (Sislert und Shang, 1984) sowie der anionische STS-Komplex (Beyer, 1976). Wie sich eine Behandlung mit AVG bzw. STS auf die Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen auswirkt, wurde im Folgenden untersucht. Dabei sind nur die Ergebnisse des für das Kombinationsexperiment ausgewählten Inhibitors gezeigt. Alle weiteren Ergebnisse sind im Anhang unter Punkt 6.3 dargestellt.

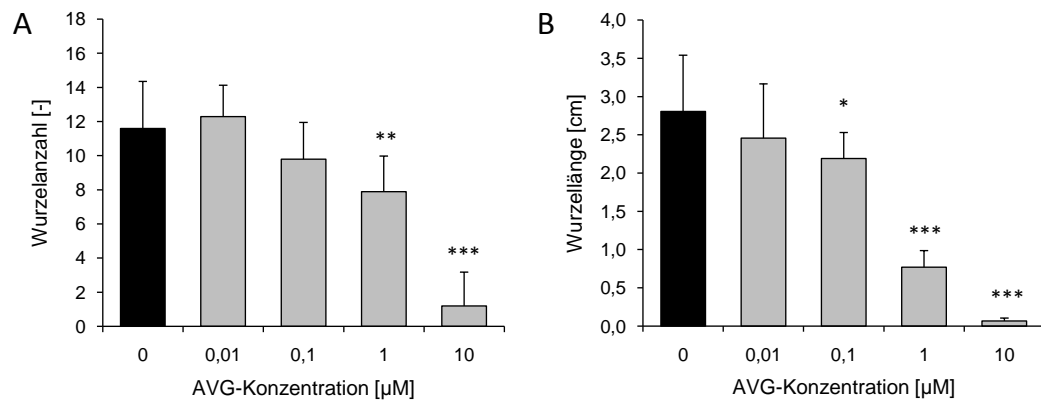


Abbildung 3-15: Die konzentrationsabhängige Wirkung von AVG auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (n=10) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (* p<0,05; ** p<0,01; *** p < 0,001).

Die Anzahl der neu gebildeten Adventivwurzeln nahm infolge einer AVG-Behandlung in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration ab (Abbildung 3-15 A). Die Wurzelanzahl verringerte sich nach Applikation von 1 µM AVG im Vergleich zur Kontrolle um 33 % und nach Applikation von 10 µM AVG um 90 %. Eine Behandlung der Stecklinge mit STS lieferte ähnliche Ergebnisse, wobei erst ab einer STS-Konzentration von 100 µM eine verminderte Wurzelanzahl nachzuweisen war (Anhang, Abbildung 6-7 A). Des Weiteren waren die regenerierten Adventivwurzeln der

mit AVG behandelten Stecklinge kürzer als die der Unbehandelten. Nach Gabe von 0,1 μM AVG reduzierte sich die durchschnittliche Wurzellänge um 22 % und nach Gabe von 10 μM AVG um 96 % (Abbildung 3-15 B). Die Applikation von STS hatte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der durchschnittlichen Wurzellänge zur Folge. Dies war jedoch erst ab einer STS-Konzentration von 100 μM zu beobachten (Anhang, Abbildung 6-7 B).

Der Auxin-Gehalt bzw. die Auxin-Verteilung in Pflanzen kann über eine Inhibierung des polaren Auxin-Transports beeinflusst werden. Zur Gruppe der Auxin-Transport-Inhibitoren gehören 1-N-Naphthylphthalaminsäure (NPA; Gil *et al.*, 2001) und 2,3,5-Triiodobenzoessäure (TIBA; Geldner *et al.*, 2001). Neben den erwähnten Substanzen kann das Auxin-Analogon *p*-Chlorophenoxyisobuttersäure (PCIB) ebenfalls die Auxin-Wirkung beeinträchtigen, wobei hier von einem anderen Mechanismus auszugehen ist. Es wird vermutet, dass PCIB und Auxin um die Bindung an den Auxin-Rezeptor konkurrieren (MacRae und Bonner, 1953; Oono *et al.*, 2003). Für die folgenden Experimente wurden NPA, TIBA bzw. PCIB in verschiedenen Konzentrationen getestet, um deren Wirkung auf die Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen zu untersuchen. Aufgrund der Übersichtlichkeit sind nur die Ergebnisse des für das Kombinationsexperiment ausgewählten Inhibitors abgebildet. Die Ergebnisse aller anderen getesteten Substanzen sind im Anhang unter Punkt 6.3 aufgeführt.

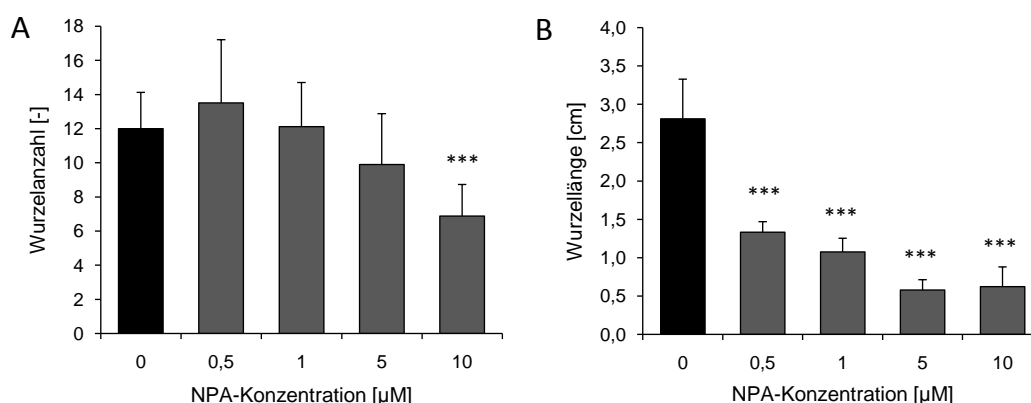


Abbildung 3-16: Die konzentrationsabhängige Wirkung von NPA auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte ($n=10$) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (***) $p < 0,001$).

Nach der Applikation von NPA war zu beobachten, dass die behandelten Stecklinge weniger Adventivwurzeln regenerierten als die Unbehandelten. Bei einer NPA-Konzentration von 10 μM reduzierte sich die Wurzelanzahl im Vergleich zur Kontrolle um 42 % (Abbildung 3-16 A). Eine Behandlung der Stecklinge mit TIBA bewirkte ebenfalls eine verminderte Wurzelregeneration (Anhang, Abbildung 6-8 A). Das Auxin-Analogon PCIB hatte dagegen keinen Einfluss auf die Anzahl der neugebildeten Wurzeln (Anhang, Abbildung 6-8 A). Eine NPA-Applikation beeinflusste aber nicht nur die Wurzelanzahl, sondern führte auch dazu, dass die behandelten Stecklinge kürzere Wurzeln regenerierten als die Unbehandelten. Nach Gabe von 0,5 μM NPA war eine

Abnahme der durchschnittlichen Wurzellänge um 54 % und nach Gabe von 10 μM NPA um 79 % nachzuweisen (Abbildung 3-16 B). Eine Behandlung mit TIBA und PCIB führte zu ähnlichen Ergebnissen (Anhang, Abbildung 6-8 B).

Im folgenden Experiment sollte nun untersucht werden, wie sich eine JA-Behandlung bei reduzierten Auxin- und Ethylen-Gehalten auf die Bewurzelung der *Petunia*-Stecklinge auswirkt. Für die Beantwortung der Fragestellung wurde JA zusammen mit dem Ethylen-Biosynthese-Inhibitor AVG und dem Auxin-Transport-Inhibitor NPA appliziert. Beide Inhibitoren wurden für das Kombinationsexperiment ausgewählt, da sie im Vergleich zu den anderen getesteten Substanzen die Stecklingsbewurzelung effektiver beeinflussten.

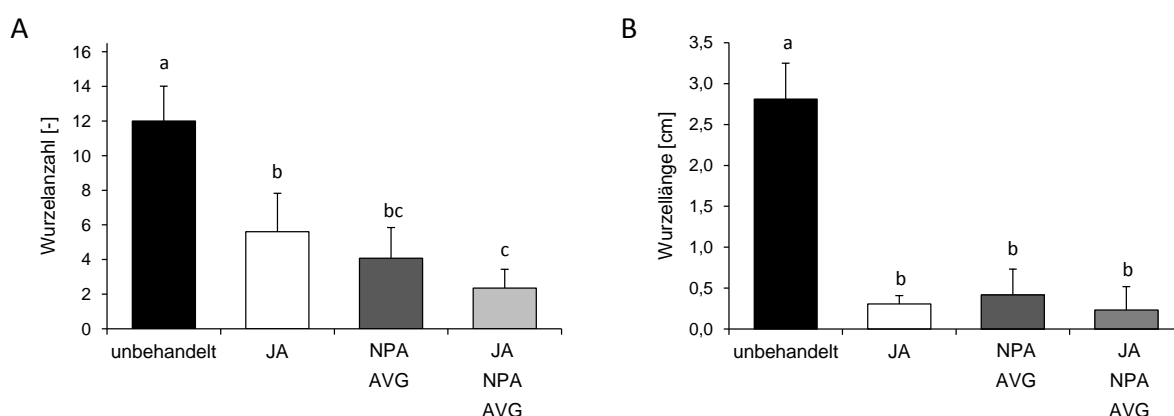


Abbildung 3-17: Die Wirkung einer gleichzeitigen Applikation von NPA (10 μM), AVG (10 μM) und JA (10 μM) auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte ($n=10$) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz ($p<0,05$) wurde mittels einfaktorier Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Wie bereits durch Abbildung 3-9 A belegt wurde, inhibierte JA auch im folgenden Experiment die Regeneration von Adventivwurzeln. Die Anzahl der neugebildeten Wurzeln nahm nach Applikation von JA im Vergleich zur Kontrolle um 52 % ab (Abbildung 3-17 A). Nach der gleichzeitigen Behandlung der Stecklinge mit AVG und NPA war ebenfalls eine um 65 % reduzierte Wurzelanzahl nachzuweisen. Der durch die JA-Applikation bedingte Abfall der Wurzelanzahl wurde infolge einer zusätzlichen Gabe von NPA und AVG verstärkt. Somit reduzierte sich die Anzahl der regenerierten Adventivwurzeln um weitere 32 % (insgesamt um 84 %, siehe Abbildung 3-17 A).

Ebenso inhibierte JA das Längenwachstum der Wurzeln (siehe auch Abbildung 3-9 B). So waren die regenerierten Adventivwurzeln der mit JA-behandelten Stecklinge um 89 % kürzer als die der unbehandelten (Abbildung 3-17 B). Die durchschnittliche Länge der Wurzeln wurde ebenfalls durch eine gleichzeitige Gabe von AVG und NPA um 86 % reduziert. Die zusätzliche Applikation der Inhibitoren hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf die infolge der JA-Behandlung bedingte Reduktion der Wurzellänge (Abbildung 3-17 B).

Mit Hilfe der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurde gezeigt, dass eine Behandlung der *Petunia*-Stecklinge mit Jasmonaten eine Abnahme von Wurzelanzahl und durchschnittlicher Wurzellänge bewirkt. Der inhibierende Effekt der JA auf die Anzahl der neu gebildeten Adventivwurzeln wird infolge einer zusätzlichen Applikation von IAA oder ACC abgeschwächt und infolge von reduzierten Auxin- und Ethylen-Gehalten verstärkt.

3.3.2 Der Einfluss einer modulierten Jasmonat-Biosynthese auf den Bewurzelungsprozess

Die unter 3.3.1 dargestellten pharmakologischen Experimente geben erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der Jasmonate im Prozess der Adventivwurzelentwicklung in *Petunia hybrida*. Die Interpretation der auf diesem Wege erhaltenen Ergebnisse wird jedoch dadurch erschwert, dass die Wirksamkeit der applizierten Substanzen durch die Aufnahme, den Transport und die Umwandlung in biologisch aktive bzw. inaktive Substanzen beeinflusst wird. Deshalb war das Ziel eines zweiten experimentellen Ansatzes, die endogenen Gehalte der Jasmonate in *Petunia hybrida* zu verändern. Das Modulieren der Gehalte sollte dabei über das Schlüsselenzym der Jasmonat-Biosynthese, die AOC, erfolgen, wobei die nachfolgenden Ansätze auf eine Änderung der Expression des für die AOC kodierenden Gens zielen.

Die Insertionsmutagenese (Insertion von T-DNA oder Transposon) ermöglicht es, die Funktionalität von Genen zu beeinträchtigen und daraus resultierend das entsprechende Genprodukt zu reduzieren bzw. zu eliminieren. Für das Modellsystem *Petunia* stehen verschiedene Populationen von Insertionsmutanten zu Verfügung und im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, eine dieser Population zu untersuchen. Dabei sollten mögliche Mutanten selektiert werden, bei denen die Funktionalität der *PhAOC* beeinträchtigt ist.

Eine weitere Möglichkeit, das Genprodukt der *PhAOC* zu reduzieren, besteht darin, den Mechanismus der *RNA-Interferenz* (RNAi) zu nutzen. Der RNAi-Effekt ist dadurch charakterisiert, dass das Einbringen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in die Pflanze einen spezifischen Abbau komplementärer Ziel-mRNA zur Folge hat und daraus resultierend die Menge des entsprechenden Genprodukts reduziert wird. DsRNAs können unter anderem dadurch erzeugt werden, dass entsprechende Fremd-DNA über Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in die Pflanze eingebracht wird. Die hierfür generierten Vektoren enthalten einen Sequenzabschnitt des ausgewählten Gens in *sense*- und *antisense*-Orientierung, was die Transkription der dsRNA ermöglichen sollte.

Mittels RNAi-Effekt und mit Hilfe der Insertionsmutanten müsste es möglich sein, die Gehalte an Jasmonat in der Pflanze zu reduzieren. Um im Gegensatz dazu den Gehalt der Jasmonate zu erhöhen, sollte die AOC überexprimiert werden. Für das Modellsystem *Petunia* ist der Effekt der Co-Suppression homologer Gene beschrieben, welcher nicht in einem Anstieg sondern in einer Verringerung der Menge an Genprodukt resultieren würde (Napoli *et al.*, 1990). Dieser Effekt kann durch die Überexpression einer Spezies-fremden AOC umgangen werden, weshalb neben der *PhAOC* auch die AOC aus *Medicago truncatula* (*MtAOC1*; AJ308489) in *Petunia* überexprimiert wurde. Trotz einer vergleichbaren enzymatischen Aktivität von *MtAOC1* und *PhAOC* (persönliche Mitteilung Hause) weist die Nukleotid-Sequenz des für die *MtAOC1* kodierenden Berei-

ches im Vergleich zur *PhAOC* nur eine Homologie von 66 % auf. Diese geringe Ähnlichkeit zwischen beiden Nukleotid-Sequenzen müsste ausreichen, um den Mechanismus der Co-Suppression zu unterbinden. Für die Überexpression der *PhAOC* bzw. *MtAOC1* wurden entsprechende binäre Vektoren generiert und über Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in *Petunia* transferiert.

3.3.2.1 Die Analyse einer Population von *dTph1*-Insertionsmutanten

Im Folgenden wurde eine Population von Insertionsmutanten (*Petunia hybrida* Linie W138) untersucht, bei denen die Funktionalität von Genen durch die Aktivität transposabler Elemente (TE) beeinträchtigt wird. Das gehäufte Auftreten von Mutationen in der Nachkommenschaft der verwendeten W138 Linie resultiert aus dem repetitiven Vorkommen (bis zu 200 Kopien) und der hohen Transpositionsfrequenz des TE *dTph1* (*defective transposon Petunia hybrida*; Doodeman und Bianchi, 1985; Gerats *et al.*, 1989; Huits *et al.*, 1995; Van Houwelingen *et al.*, 1998). Dieses einem zwei Komponenten System angehörende *dTph1*-Element ist mit 284 bp relativ klein und enthält terminal die für die Ds-Gruppe TE charakteristische, invers sich wiederholende Nukleotid-Sequenz (Anhang, Abbildung 6-9; Gerats *et al.*, 1990; Van Houwelingen *et al.*, 1998). Die Transpositionsaktivität des *dTph1*-Elements wird durch den Aktivator *ACT1* reguliert, welcher stabil auf Chromosom I lokalisiert ist und für eine Transposase kodiert (Huits *et al.*, 1995; Stuurman und Kuhlemeier, 2005).

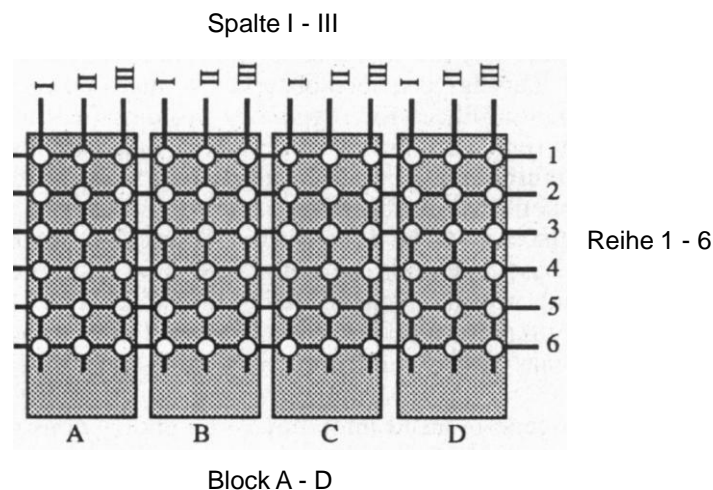


Abbildung 3-18: Das dreidimensionale System, nach dem das Pflanzenmaterial für die Analyse einer Population von *dTph1*-Insertionsmutanten geerntet wurde. Die weißen Kreise zeigen die Position der jeweiligen Pflanze im Gewächshaus an. Von jeder Pflanze wurde dreimal Blattmaterial geerntet. Anschließend wurde das Material vereinigt: einmal entsprechend Block A-D, einmal entsprechend Reihe 1-6 und einmal entsprechend Spalte I-III. Die Abbildung wurde nach Koes *et al.* (1995) verändert.

Um gezielt Mutanten mit *dTph1*-Insertion in einem spezifischen Gen aus einer großen Population von Pflanzen zu selektieren, entwickelte Koes *et al.* (1995) eine spezielle Methode. Von einer 4000 Pflanzen umfassenden Population wurde von jeder Pflanze Blattmaterial geerntet und dieses dreimal nach jeweils einem anderen Schema vereinigt (Abbildung 3-18). Mit Hilfe dieses Sys-

tems wurde die Anzahl der zu analysierenden Proben von 4000 auf 137 reduziert und das Blattmaterial jeder Pflanze war so in einer einmaligen Kombination von Block, Reihe sowie Spalte vertreten. Die aus dem vereinigten Pflanzenmaterial isolierte genomische DNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Ferner wurden alle Pflanzen der Population geselbstet und die Aufbewahrung der ausgebildeten Samenkapseln erfolgte bei 12 °C. Auf diesem Wege wurde eine semipermanente Bibliothek an *dTph1*-Insertionsmutanten erzeugt, die freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. R. Koes zur Verfügung gestellt wurde, um sie im Hinblick auf mögliche *dTph1*-Insertionen im *PhAOC* Gen hin zu untersuchen.

Die Analyse der *dTph1*-Insertionsmutanten erfolgte mittels PCR nach Koes *et al.* (1995). Dabei wurden für die PCR die aus dem Blattmaterial isolierte genomische DNA als Matrize sowie ein *PhAOC*-spezifisches Oligonukleotid und ein *dTph1*-spezifisches Oligonukleotid eingesetzt. Letzterer war komplementär zu der terminalen invers sich wiederholenden Nukleotid-Sequenz des *dTph1*-Elements (Anhang, Abbildung 6-9). Somit war es einerseits möglich, *dTph1*-Insertionen unabhängig von deren Orientierung aufzufinden. Andererseits hatte die Wahl der Oligonukleotide den Nachteil, dass nicht nur *dTph1*-Insertionen im *PhAOC* Gen nachzuweisen waren, sondern dass auch DNA-Abschnitte zwischen zwei benachbarten *dTph1*-Elementen amplifiziert wurden. Aus diesem Grund war es erforderlich, die amplifizierten DNA-Fragmente spezifisch nachzuweisen. Hierfür wurde die DNA auf Nylon-Membranen transferiert und mit einer *PhAOC*-spezifischen Sonde hybridisiert. Abbildung 3-19 stellt ein typisches Ergebnis des spezifischen Nachweises einer *dTph1*-Insertion im *PhAOC* Gen dar. Wie zu erkennen ist, konnte nach der Hybridisierung je ein starkes Signal gleicher Fragment-Größe in jeder der drei Dimensionen detektiert werden (roter Pfeil). Mit Hilfe der den DNA-Fragmenten zugeordneten Koordinaten (Block N, Reihe 12, Spalte II) wurde anhand des in Abbildung 3-18 dargestellten Systems die entsprechende Pflanze identifiziert.

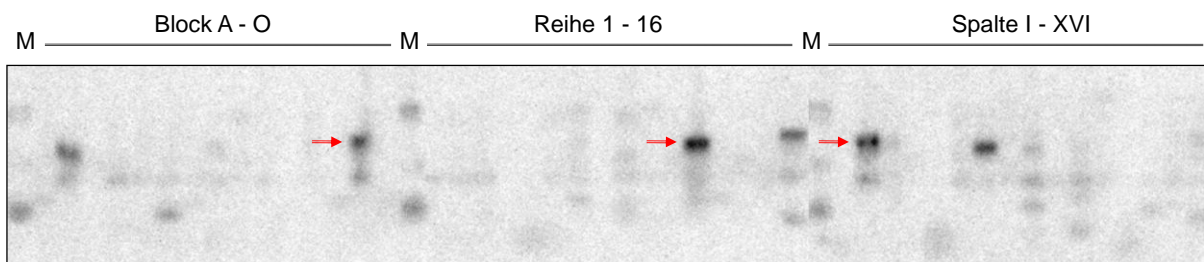


Abbildung 3-19: Die Identifizierung von *dTph1*-Insertionen im *PhAOC* Gen aus einer Population von Insertionsmutanten nach einer durch Koes *et al.* (1995) entwickelten Methode (siehe auch 2.6). Exemplarisch ist ein spezifischer Nachweis einer *dTph1*-Insertion im *PhAOC*-Gen dargestellt. Mit roten Pfeilen sind Signale angezeigt, die die gleiche Fragment-Größe in jeder der drei Dimensionen (Block, Reihe, Spalte) aufwiesen. **M** Marker.

Die Analyse der *dTph1*-Insertionsmutanten ergab sechs Treffer für mögliche Mutanten mit Insertion im *PhAOC* Gen. Um nachzuweisen, dass die Funktionalität des *PhAOC* Gens infolge der *dTph1*-Insertion beeinträchtigt ist, war es erforderlich, aus den freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. R. Koes zur Verfügung gestellten Samen, Pflanzen anzuziehen. Dies war jedoch aufgrund der nicht mehr vorhandenen Keimfähigkeit des Saatguts nicht möglich. Der Ansatz, die

Jasmonat-Gehalte in *Petunia* über die AOC mit Hilfe von *dTph1*-Insertionsmutanten zu verändern, konnte somit nicht weiterverfolgt werden.

3.3.2.2 Die Generierung transgener AOC-sense sowie *PhAOC-RNAi* Pflanzen

Die Erzeugung des binären Vektors 35S::*PhAOC-RNAi*

Für die Erzeugung des binären Vektors 35S::*PhAOC-RNAi* wurde ein im 3'-Bereich der kodierenden Sequenz des *PhAOC* Gens liegendes, 180 bp umfassendes Fragment ausgewählt (Anhang, Abbildung 6-1 A). Dieses wurde mittels PCR amplifiziert und anschließend unter Verwendung der Gateway-Technologie in den binären Vektor pHellsgate 8 inseriert (siehe 2.7). Die Transfer-DNA (T-DNA), welche später mittels *Agrobacterium tumefaciens* in *Petunia* übertragen werden sollte, ist in Abbildung 3-20 A dargestellt. Sie bestand aus dem 2x35S Promotor des *Cauliflower mosaic virus* (2x35S *CaMV*), dem amplifizierten *PhAOC* Fragment in *sense* Orientierung, einem Insert, dem *PhAOC* Fragment in *antisense* Orientierung und der Terminationssequenz der *Octopinsynthase* aus *Agrobacterium tumefaciens* (*OCS term*). Weiterhin enthielt die T-DNA das eine Kanamycin-Resistenz vermittelnde Gen *Neomycin Phosphotransferase II* (*NPTII*), mit dessen Hilfe die spätere Selektion transgener Pflanzen möglich wurde.

Zusätzlich zum Vektor 35S::*PhAOC-RNAi* wurde der Kontroll- bzw. leerer Vektor (LV)pHellsgate 8 generiert (siehe 2.7), wobei dessen T-DNA ausschließlich das *NPTII* Gen unter Kontrolle des Promotors der *Nopalinsynthase* aus *Agrobacterium tumefaciens* (*NOS prom*) sowie die *NOS*-Terminationssequenz (*NOS term*) enthielt.

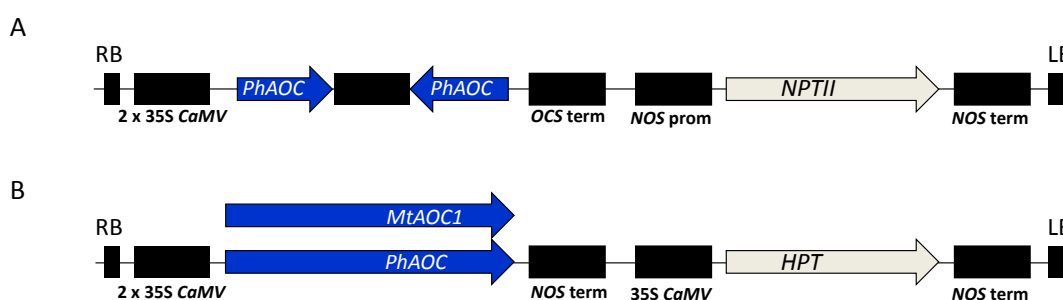


Abbildung 3-20: Schematische Darstellung der T-DNA der binären Vektoren (A) 35S::*PhAOC-RNAi* sowie (B) 35S::*PhAOC-sense* und 35S::*MtAOC1-sense*. **RB** right border, **LB** left border, **2 x 35S CaMV** 2x35S Promotor des *Cauliflower mosaic virus*, **NOS term** Terminator der *Nopalinsynthase* aus *Agrobacterium tumefaciens*, **OCS term** Terminator der *Octopinsynthase* aus *Agrobacterium tumefaciens*, **NOS prom** Promotor der *Nopalinsynthase* aus *Agrobacterium tumefaciens*, **NPTII** Neomycin Phosphotransferase, **HPT** Hygromycin Phosphotransferase.

Die Erzeugung der binären Vektoren 35S::*PhAOC-sense* und 35S::*MtAOC1-sense*

Für die Erzeugung der binären Vektoren 35S::*PhAOC-sense* bzw. 35S::*MtAOC1-sense* wurde der kodierende Bereich der *PhAOC* bzw. *MtAOC1* (AJ308489) mittels PCR amplifiziert und unter

Verwendung der *Gateway*-Technologie in den binären Vektor pMDC 32 inseriert (siehe 2.7). Die T-DNA enthielt somit die unter der Kontrolle des 2x35S*CaMV* Promotors stehende cDNA der *PhAOC* bzw. *MtAOC1* sowie das eine Hygromycin-Resistenz vermittelnde *Hygromycin B-Phosphotransferase* Gen (*HPT*), welches die spätere Selektion der transgenen Pflanzen ermöglichte (Abbildung 3-20 B).

Zusätzlich zu den Vektoren *35S::PhAOC-sense* bzw. *35S::MtAOC1-sense* wurde der Kontrollvektor LVpMDC 32 generiert (siehe 2.7), wobei dessen T-DNA ausschließlich das *HPT* Gen unter Kontrolle des 35S *CaMV* Promotors sowie die *NOS* term enthielt.

Die stabile Transformation von *Petunia*

Der Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mit dem jeweiligen binären Vektor bzw. Kontrollvektor schloss sich die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Petunia* nach der unter 2.3.3 beschriebenen Methode an. Hierfür wurden die transformierten Agrobakterien zusammen mit den Blattstücken steriler *Petunia*-Pflanzen inkubiert. Die Blattstücke wurden dann auf Antibiotika enthaltendes Regenerationsmedium überführt. Vor diesem Schritt war es erforderlich, die für die Selektion optimalen Antibiotika-Konzentrationen zu ermitteln. Dies geschah, indem Blattstücke von nicht transformierten *Petunia*-Pflanzen auf Regenerationsmedium mit verschiedenen Hygromycin- bzw. Kanamycin-Konzentrationen ausgelegt wurden. Die Ausbildung von Kalli bzw. Sprossen wurden ab einer Kanamycin-Konzentration von 100 µg/ml und ab einer Hygromycin-Konzentration von 10 µg/ml inhibiert (Daten nicht dargestellt), sodass die Antibiotika in diesen Konzentrationen für die Selektion zur Anwendung kamen. Nach einer zweiwöchigen Inkubation der mit Agrobakterien behandelten Blattstücke auf dem Regenerationsmedium bildeten sich an den Außenseiten der Blattstücke erste Kalli, aus denen sich nach weiteren drei Wochen Sprosse regenerierten. Die Sprosse wurden von den Kalli abgetrennt und auf MS-Medium transferiert, wobei die Bewurzelung der Sprosse innerhalb der nächsten vier Wochen einsetzte. Auf diesem Wege regenerierten 200 Pflanzen, die vor dem Topfen in Erde auf das Vorhandensein des entsprechenden Transgens mittels PCR hin untersucht wurden (siehe 2.7).

3.3.2.3 Die Selektion der Primärtransformanten (Generation T0)

Inwiefern die erfolgreiche Insertion der T-DNA in das pflanzliche Genom die gewünschten Änderungen in der Akkumulation des AOC-Transkripts hervorruft, sollte mittels qRT-PCR untersucht werden. Für diese Analyse wurde von den nicht transformierten und den 82 die T-DNA enthaltenden transgenen Pflanzen ausschließlich Material von verwundeten Blättern verwendet, da in unverwundetem Pflanzenmaterial kaum AOC-Transkript nachgewiesen werden konnte (3.1.2.2).

Zwischen den nicht transformierten (WT) und den mit dem LVpMDC 32 Vektor transformierten (pMDC) Pflanzen waren keine Unterschiede in der Akkumulation des AOC Transkripts nachzuweisen (Abbildung 3-21 A). Dies traf auch für die meisten *PhAOC-sense*- bzw. *MtAOC1-sense*-Pflanze zu. Lediglich in der *PhAOC-sense*-Pflanze 5 sowie in der *MtAOC1-sense*-Pflanze 5 akkumulierte das Transkript der AOC verstärkt, wobei die AOC Transkript-Akkumulation in beiden Primärtransformanten um ein 40faches höher ausfiel als in den WT- bzw. pMDC-Pflanzen. Wei-

terhin ist Abbildung 3-21 B zu entnehmen, dass das *AOC*-Transkript in den mit dem LVpHells-gate 8 Vektor transformierten (pHell)- im Vergleich zu den WT-Pflanzen vermehrt oder in ähnlicher Stärke akkumulierte. Dies traf auch auf 40 % der regenerierten *PhAOC-RNAi*-Pflanzen zu. Im Vergleich dazu wurde in zwölf von 20 *PhAOC-RNAi*-Pflanzen eine verminderte Akkumulation des *AOC*-Transkripts nachgewiesen. Dabei war die *AOC*-Transkript-Akkumulation in den Primärtransformanten um bis zu 92 % reduziert (bezogen auf WT- bzw. pHell-Pflanzen).

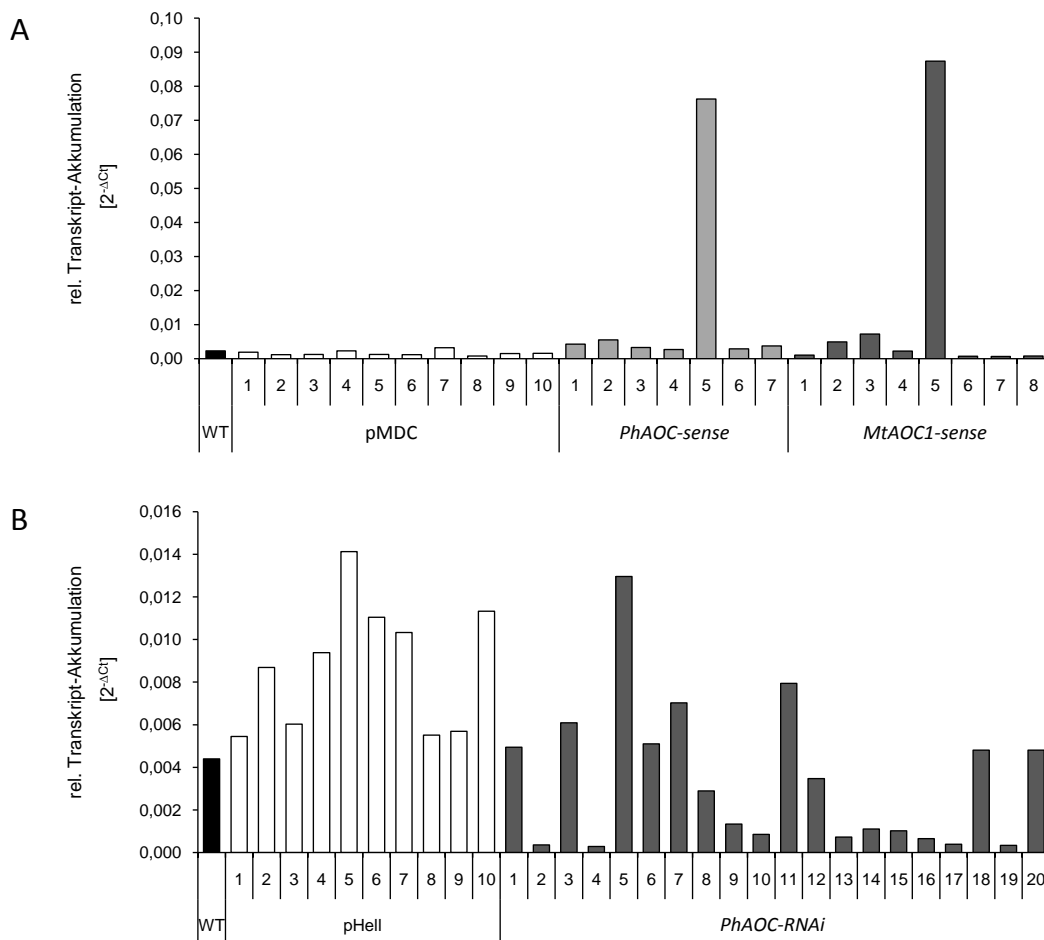


Abbildung 3-21: Die Akkumulation des *AOC*-Transkripts in den **A** *PhAOC-sense*- bzw. *MtAOC1-sense*-Pflanzen sowie in den **B** *PhAOC-RNAi*-Pflanzen. Als Ausgangsmaterial für die qRT-PCR-Analyse (siehe 2.5.2.8) wurden verwundete Blätter der Spross-Spitze (zwei Stunden nach Verwundung) verwendet. Für die Berechnung der relativen Transkript-Akkumulation diente *RPS13* als Referenz-Gen.

Neben der Akkumulation des *AOC*-Transkripts wurde auch von jeweils zehn pHell- bzw. pMDC-Pflanzen sowie von allen 14 Primärtransformanten mit veränderter *AOC*-Transkript-Akkumulation die Anzahl der in ihr Genom integrierten T-DNA ermittelt. Diese Analyse sollte eine Aussage in Hinblick auf die Vererbung der T-DNA in der Nachkommenschaft der folgenden Generation (T1) ermöglichen. Für die spätere stabile Vermehrung transgener Pflanzen ist die Generierung homozygoter Pflanzen unerlässlich.

Die Kopien-Anzahl der inserierten T-DNA wurde mittels Southern Blot-Analyse bestimmt. Die für diese Analyse verwendete Restriktionsendonuklease wurde so gewählt, dass innerhalb der T-DNA keine Erkennungssequenzen für dieses Enzym existieren. Aufgrund der fehlenden Schnittstelle in der T-DNA müsste die Anzahl der im Southern Blot spezifisch nachgewiesenen DNA-Fragmente der Kopien-Anzahl der in das pflanzliche Genom inserierten T-DNA entsprechen. Weiterhin konnte aufgrund der verwendeten Restriktionsendonuklease die Größe der DNA-Fragmente nicht vorhergesagt werden, da sich diese nach den jeweils nächsten im pflanzlichen Genom liegenden Erkennungssequenzen des Enzyms richtete.

Mit Hilfe der Southern Blot-Analyse wurden für den überwiegenden Teil der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen zwei DNA-Fragmente spezifisch nachgewiesen (Abbildung 3-22 A). Nur die *PhAOC-RNAi*-Pflanzen 12 und 13 enthielten in ihrem Genom mehr als zwei Kopien der integrierten T-DNA. Für die *PhAOC-RNAi*-Pflanzen 8 und 9 war eine Auswertung der Southern Blot-Analyse nicht möglich. Hinsichtlich der pHell-Pflanzen wurden nur spezifische Signale für die Pflanzen 4, 5 und 6 detektiert (Abbildung 3-22 B). Das Genom der pHell-Pflanze 4 enthielt zwei und das der pHell-Pflanzen 5 und 6 enthielt jeweils eine Kopie der T-DNA. Für die *PhAOC-sense*-Pflanze 5 sowie für die *MtAOC1-sense*-Pflanze 5 musste von mindestens drei bis vier Insertionen ausgegangen werden, wobei aufgrund des starken Hintergrunds keine genauere Auswertung des Southern Blots möglich war (Abbildung 3-22 C). Für die Mehrzahl der getesteten pMDC-Pflanzen konnte leider keine Aussage in Bezug auf die Anzahl der Kopien der inserierten T-DNA getroffen werden. Nur für die pMDC-Pflanzen 3 und 8 wurden spezifische Signale detektiert. Das Genom der pMDC-Pflanze 3 enthielt drei und das der pMDC-Pflanze 8 enthielt fünf Kopien der T-DNA.

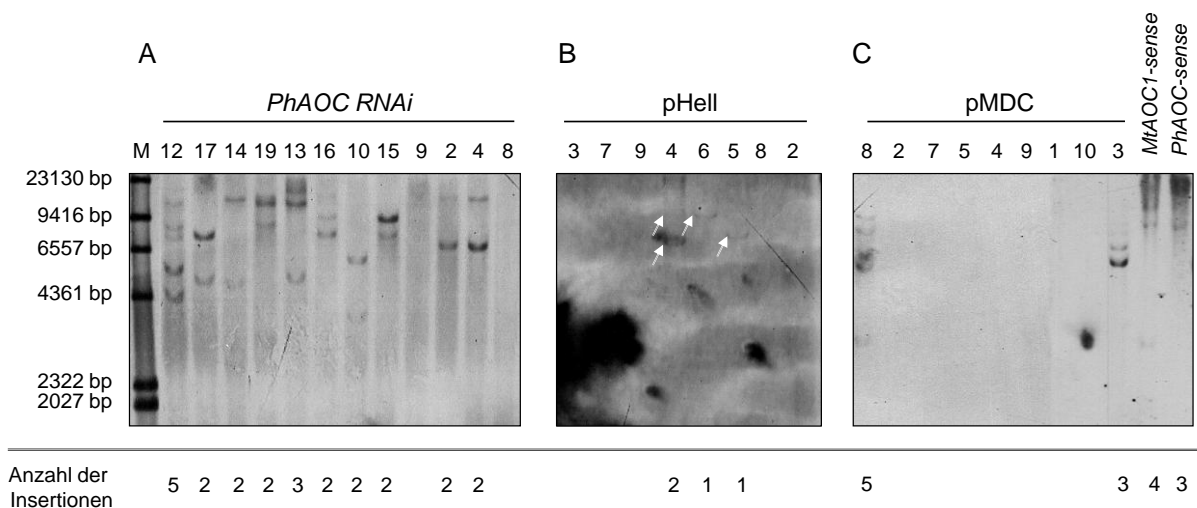


Abbildung 3-22: Die Anzahl der T-DNA-Insertionen im Genom der **A** *PhAOC-RNAi*-, **B** pHell- sowie der **C** pMDC-, *PhAOC-sense*- und *MtAOC1-sense*-Pflanzen. Die Analyse erfolgte mittels Southern Blot (siehe 2.5.2.9). Für die enzymatische Spaltung der genomischen DNA wurde die Restriktionsendonuklease *EcoRI* verwendet. Mit **M** ist der Marker bezeichnet und mit weißen Pfeilen sind DNA-Fragmente angezeigt, die aufgrund des starken Hintergrunds schlecht zu erkennen sind.

Angesichts dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass vermutlich nur die Nachkommen der pHell-Pflanzen 5 und 6 dem klassischen Vererbungsmuster von 1:2:1 folgen werden. Das würde

bedeuten, dass 25 % der Nachkommenschaft dieser Pflanzen in Bezug auf die inserierte T-DNA homozygot sind. Der Anteil an homozygoten, die T-DNA tragenden Pflanzen in der Nachkommenschaft aller anderen Primärtransformanten würde nur ca. 6 % oder weniger betragen.

Anhand der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden folgende Primärtransformanten ausgewählt, um Saatgut zu gewinnen. Dieses wurde für die Generierung der Folgegeneration T1 verwendet.

- *PhAOC-sense* 5
- *MtAOC1-sense* 5
- pMDC 3 und 8
- *PhAOC-RNAi* 4, 10 und 15
- pHell 5 und 6

3.3.2.4 Die Charakterisierung der *AOC-sense*-Pflanzen (Generation T1)

Alle auf Selektionsmedium angezogenen Pflanzen wurden zunächst auf das Vorhandensein der T-DNA hin untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe der PCR unter Verwendung T-DNA-spezifischer Oligonukleotide (siehe 2.7). Von den positiv getesteten Pflanzen wurde dann analog zur Selektion der Primärtransformanten die *AOC*-Transkript-Akkumulation mittels qRT-PCR untersucht (siehe 2.5.2.8).

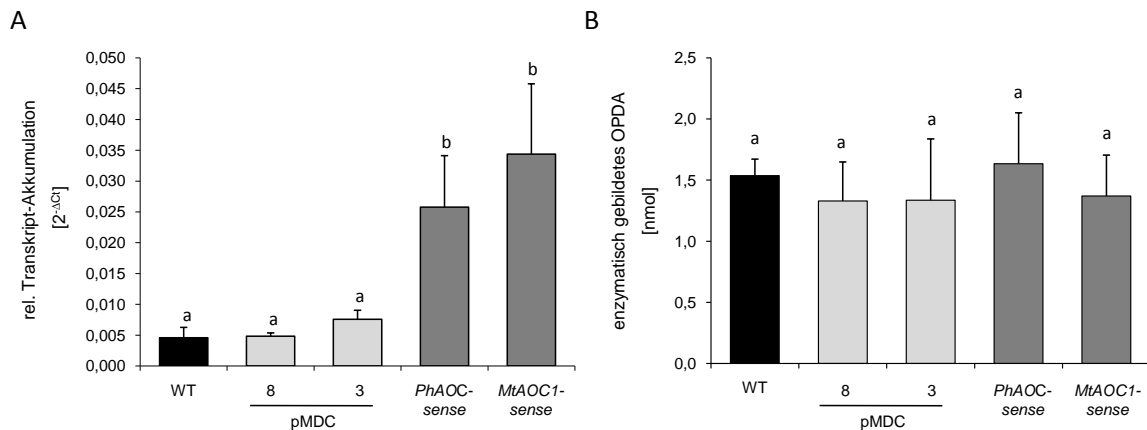


Abbildung 3-23: **A** Die Akkumulation des *AOC*-Transkripts sowie **B** die enzymatische Aktivität der *AOC* in den Pflanzen der *AOC-sense*-Linien. Als Ausgangsmaterial für **A** wurden Blätter der Spross-Spitze zwei Stunden nach Verwundung verwendet. Für die Berechnung der relativen Transkript-Akkumulation diente *RPS13* als Referenz-Gen. Als Ausgangsmaterial für **B** wurde Stängelmateriale von unverwundeten Stecklingen direkt nach der Ernte eingesetzt, wobei von den Proteinrohextrakten 35 µg Protein Verwendung fanden. Die Diagramme stellen Mittelwerte (WT, pMDC: n=4; *PhAOC*, *MtAOC1*: n=8) und Standardabweichungen dar. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Es waren keine Unterschiede zwischen WT- und pMDC-Pflanzen hinsichtlich der *AOC*-Transkript-Akkumulation nachzuweisen (Abbildung 3-23 A). In den Pflanzen der *PhAOC-sense*

bzw. der *MtAOC1-sense*-Linien akkumulierte das AOC-Transkript verstärkt und stieg im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen durchschnittlich um das Drei- bzw. Vierfach an (Abbildung 3-23 A).

Ob sich der nachgewiesene Anstieg der AOC-Transkript-Akkumulation in den *AOC-sense*-Pflanzen auch in einem Anstieg der enzymatischen Aktivität der AOC und daraus resultierend in erhöhten Jasmonat-Gehalten niederschlägt, wurde im Folgenden untersucht. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der AOC erfolgte nach der unter 2.9.7 beschriebenen Methode. Für den gekoppelten Enzym-Aktivitätstest fand als Ausgangsmaterial Stängelmaterial von unverwundeten Stecklingen direkt nach der Ernte Verwendung.

Die erhöhte Akkumulation des AOC-Transkripts in den Pflanzen der *PhAOC-sense*- und *MtAOC1-sense*-Linien hatte keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der AOC (Abbildung 3-23 B). Sowohl in den WT- und pMDC-Pflanzen als auch in den *PhAOC-sense*- und *MtAOC1-sense*-Pflanzen wurden ähnliche Werte für das über den gekoppelten Enzym-Aktivitätstest gebildete OPDA gemessen. Die vergleichbare enzymatische Aktivität der AOC schlug sich auch im Proteinvorkommen nieder. Mit Hilfe der Western Blot-Analyse konnten keine qualitativen Unterschiede im Vorkommen der AOC zwischen den Kontroll- und den *PhAOC-sense*- bzw. *MtAOC1-sense*-Pflanzen nachgewiesen werden (Anhang, Abbildung 6-10 A). Auch die Analyse der Gehalte von OPDA, JA sowie JA-Ile zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll-Pflanzen und denen der *PhAOC-sense*- und *MtAOC1-sense*-Linien auf (Abbildung 3-24).

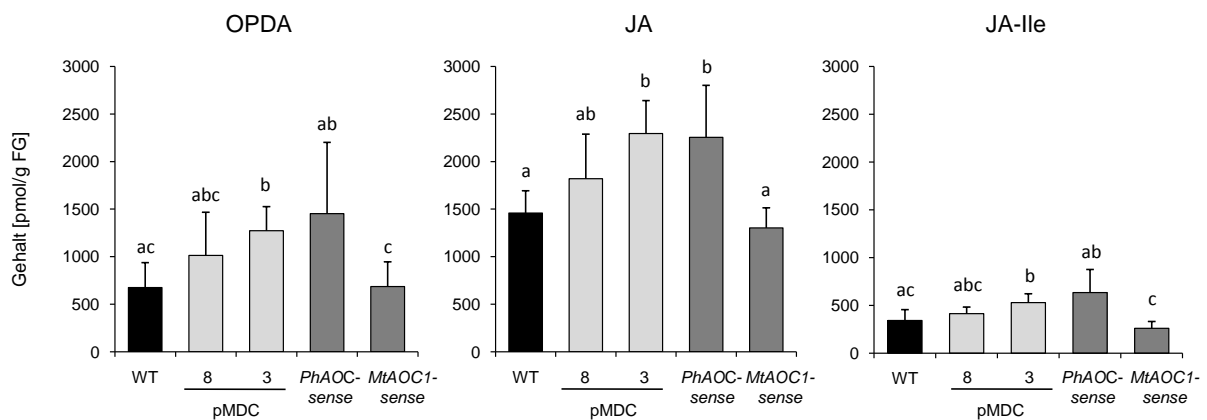


Abbildung 3-24: Die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile in den Pflanzen der *AOC-sense*-Linien. Die Bestimmung der Gehalte erfolgte wie unter 2.9.8 beschrieben. Als Ausgangsmaterial wurden drei vollständige Stecklinge 30 Minuten nach Verwundung vereinigt. Die Diagramme stellen Mittelwerte (WT, pMDC: n=4; *PhAOC*, *MtAOC1*: n=8) und Standardabweichungen dar. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Da in den Pflanze der *PhAOC-sense*- bzw. *MtAOC1-sense*-Linie trotz erhöhter AOC-Transkript-Akkumulation keine Änderungen im Vorkommen sowie in der enzymatischen Aktivität der AOC und daraus resultierend auch kein Anstieg in den Gehalten an OPDA, JA sowie JA-Ile nachgewiesen werden konnten, wurden diese Pflanzen im Folgenden nicht weiter charakterisiert.

3.3.2.5 Die Charakterisierung der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen (Generation T1)

Auch die Nachkommen der Primärtransformanten *PhAOC-RNAi* 4, 10 und 15 wurden auf das Vorhandensein der T-DNA und im Hinblick auf eine geänderte *PhAOC*-Transkript-Akkumulation hin untersucht (Abbildung 3-25 A). Zwischen den WT-Pflanzen und den Pflanzen der pHell-Linien waren keine signifikanten Unterschiede in der Akkumulation des *PhAOC*-Transkripts nachzuweisen. Im Vergleich dazu reduzierte sich die *PhAOC*-Transkript-Akkumulation in den Pflanzen der *PhAOC-RNAi* Linien um bis zu 90 %.

Ob die Reduktion des *PhAOC*-Transkripts die enzymatische Aktivität der PhAOC beeinträchtigt und ob daraus resultierend die Jasmonat-Gehalte in den *PhAOC-RNAi*-Pflanzen reduziert sind, sollte anschließend untersucht werden. Alle Analysen wurden analog zu denen der für die Charakterisierung der *AOC-sense*-Pflanzen angewandten durchgeführt (siehe 3.3.2.4).

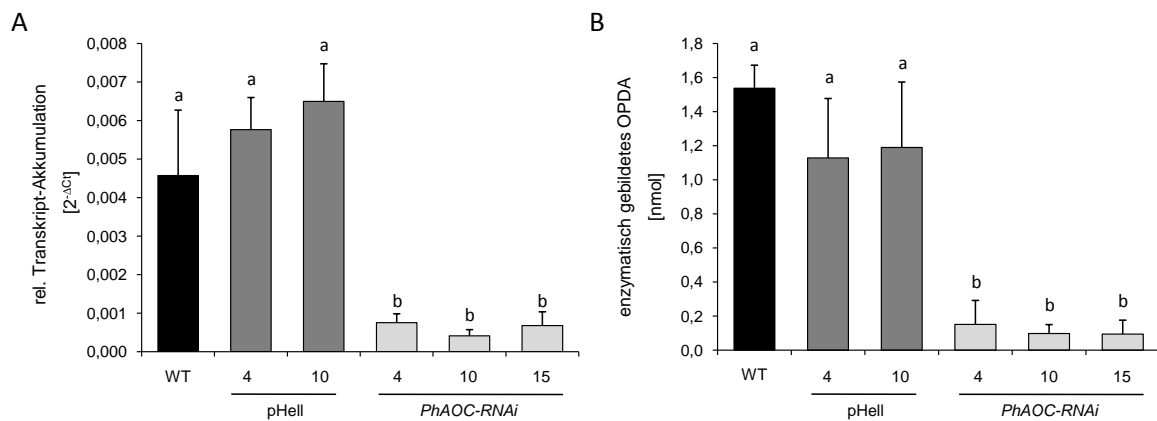


Abbildung 3-25: **A** Die Akkumulation des *PhAOC*-Transkripts (siehe 2.5.2.8) sowie **B** die enzymatische Aktivität der PhAOC (siehe 2.9.7) in den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien. Als Ausgangsmaterial für **A** wurden Blätter der Spross-Spitze zwei Stunden nach Verwundung verwendet. Für die Berechnung der relativen Transkript-Akkumulation diente *RPS13* als Referenz-Gen. Als Ausgangsmaterial für **B** wurde Stängelmaterial von unverwundeten Stecklingen direkt nach der Ernte eingesetzt, wobei von den Proteinrohextrakten 35 µg Protein Verwendung fanden. Die Diagramme stellen Mittelwerte (WT, pHell: n=4; *PhAOC-RNAi*: n=8) und Standardabweichungen dar. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Im Vergleich zu den WT- bzw. pHell-Pflanzen, zwischen denen keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen wurden, reduzierte sich die enzymatische Aktivität der PhAOC in den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien um bis zu 90 % (Abbildung 3-25 B). Die Änderungen in der enzymatischen Aktivität schlugen sich auch im Protein vorkommen der AOC nieder. Mit Hilfe der Western Blot-Analyse war nur ein spezifischer Nachweis der PhAOC in den WT- und pHell-Pflanzen möglich. In den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien konnten keine Signale für die PhAOC detektiert werden (Anhang, Abbildung 6-10 B). Die geringe enzymatische Aktivität des PhAOC Proteins reduzierte die Kapazität der Jasmonat-Biosynthese, sodass verminderte Jasmonat-Gehalte in den *PhAOC-RNAi*-Pflanzen nachzuweisen waren. Abbildung 3-26 ist zu entnehmen, dass sich die Gehalte von OPDA in den Kontroll-Pflanzen nicht unterscheiden. Im Vergleich dazu sank der OPDA-

Gehalt in den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien um bis zu 95 %. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich hinsichtlich der JA-Gehalte. Zwischen den WT-Pflanzen und der pHell-Linie 10 waren keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen. Nur die Pflanzen der pHell-Linie 4 enthielten im Vergleich zu den WT-Pflanzen mehr endogenes JA. Die JA-Gehalte in allen drei *PhAOC-RNAi*-Linien reduzierten sich im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen um ca. 65 % (*PhAOC-RNAi*-Linien 4 und 10), wobei in den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linie 15 sogar eine Reduktion um bis zu 93 % nachgewiesen wurde. Die Gehalte an JA-Ile nahmen in den WT- und pHell-Pflanzen vergleichbare Werte an. Auch zwischen den Kontroll-Pflanzen und den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien 4 und 10 waren keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen. Der JA-Ile-Gehalt reduzierte sich nur in den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linie 15 im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen um 80 %.

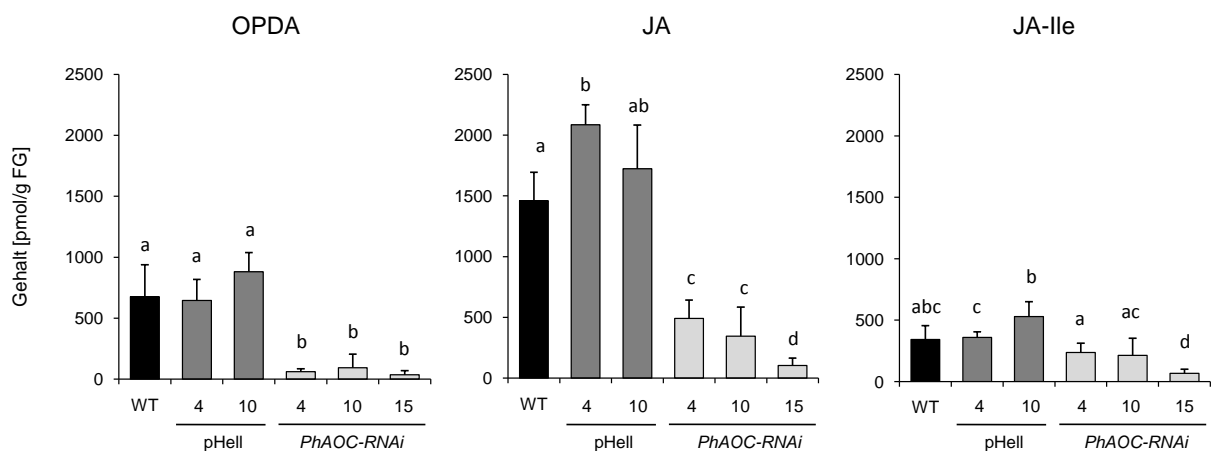


Abbildung 3-26: Die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile in den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien. Die Bestimmung der Gehalte erfolgte wie unter 2.9.8 beschrieben. Als Ausgangsmaterial wurden Stecklinge 30 Minuten nach Verwundung verwendet. Pro Pflanze wurden das Material von jeweils drei Steckling vereinigt. Die Diagramme stellen Mittelwerte (WT, pHell: n=4; *PhAOC-RNAi*: n=8) und Standardabweichungen dar. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

3.3.2.6 Der Einfluss niedriger Jasmonat-Gehalte auf den Bewurzelungsprozess

Mit Hilfe der drei unter 3.3.2.5 charakterisierten *PhAOC-RNAi*-Linien 4, 10 sowie 15 war es nun möglich, die Fragestellung zu beantworten, ob und inwiefern verringerte Jasmonat-Gehalte die Ausbildung von Adventivwurzeln in *Petunia*-Stecklingen beeinflussen. Hierfür wurden Stecklinge von WT-Pflanzen und von Pflanzen der pHell- bzw. der *PhAOC-RNAi*-Linien geerntet und in Bewurzelungssubstrat überführt. Pro Pflanze wurden fünf Stecklinge bewurzelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden sowohl die Wurzelanzahl und die durchschnittliche Wurzellänge als auch die Anzahl der Primordien pro Steckling ermittelt (siehe 2.3.2 sowie 2.10.3).

Wie bereits unter 3.1.2 dargestellt, werden erste Adventivwurzeln an der Basis von WT-Stecklingen neun Tage nach der Stecklingsernte sichtbar. Da zu diesem Zeitpunkt die Anzahl der Wurzeln innerhalb der von den WT-Pflanzen geernteten Stecklinge stark variierte, wurden die

Wurzelanzahl und die durchschnittliche Wurzellänge erst nach zwei Wochen bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren sowohl die Stecklinge der WT-Pflanzen und auch die der transgenen Pflanzen gleichmäßig bewurzelt.

Abbildung 3-27 A ist zu entnehmen, dass sich zwei Wochen nach Ernte durchschnittlich 22 Wurzeln an den von den WT-Pflanzen geernteten Stecklingen ausgebildet hatten. Die ermittelte Wurzelanzahl der von den pHell-Pflanzen geernteten Stecklinge nahmen vergleichbare Werte an. Die Stecklinge der pHell-Linie 4 bildeten 18 und die Stecklinge der pHell-Linie 10 bildeten durchschnittlich 19 Wurzeln pro Steckling aus. Im Vergleich zu den Stecklingen der Kontroll-Pflanzen reduzierte sich die Anzahl der regenerierten Adventivwurzeln an den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen signifikant. An den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Linie 4 und 10 bildeten sich durchschnittlich acht und an denen der *PhAOC-RNAi*-Linie 15 durchschnittlich sechs Wurzeln aus. Dieser Effekt war etwas weniger ausgeprägt auch drei Wochen nach der Stecklingsernte zu beobachten (Abbildung 3-27 B). Die Stecklinge der WT-Pflanzen bildeten durchschnittlich 29 und die der pHell-Linien 4 und 10 bildeten 24 bzw. 23 Wurzeln pro Steckling aus. Der Unterschied in der Anzahl der Wurzeln zwischen den Stecklingen der Kontroll- und der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen war nach drei Wochen nicht mehr so ausgeprägt wie nach zwei Wochen. Nur die Stecklinge der *PhAOC-RNAi*-Linie 10 bildeten mit elf Wurzeln pro Steckling signifikant weniger Wurzeln im Vergleich zu denen der Kontroll-Pflanzen aus. Die Anzahl der Wurzeln an den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Linie 14 und 15 war tendenziell auf durchschnittlich 16 Wurzeln pro Steckling reduziert.

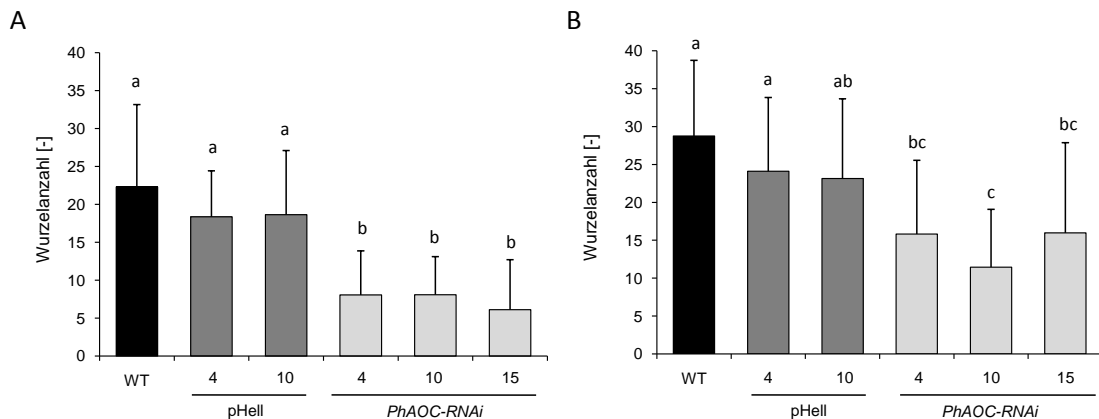


Abbildung 3-27: Die Wurzelanzahl der von Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien geernteten Stecklinge **A** zwei bzw. **B** drei Wochen nach der Stecklingsernte. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (WT, pHell: n=4; *PhAOC-RNAi*: n=8) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

In Bezug auf die durchschnittliche Länge der Adventivwurzeln waren keine Unterschiede zwischen den Stecklingen der Kontroll-Pflanzen und denen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen nachzuweisen. Die neugebildeten Wurzeln waren in den Stecklingen der WT-, pHell- sowie *PhAOC-RNAi*-Pflanzen zwei Wochen nach der Stecklingsernte im Durchschnitt 0,5 bis 0,6 cm lang (Abbildung

3-28 A). Dieses Ergebnis änderte sich auch nach drei Wochen Bewurzelungsdauer nicht (Abbildung 3-28 B). Die durchschnittliche Länge der Wurzeln betrug nach drei Wochen sowohl in den Stecklingen der Kontroll- als auch in denen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen ungefähr 0,7 cm.

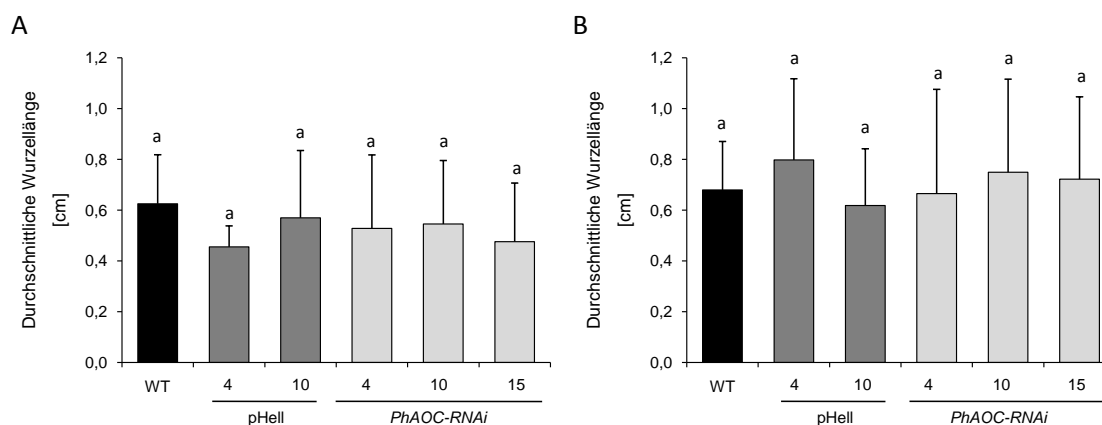


Abbildung 3-28: Die durchschnittliche Wurzellänge der von Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien geernteten Stecklinge **A** zwei bzw. **B** drei Wochen nach der Stecklingsernte. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (WT, pHell: n=4; *PhAOC-RNAi*: n=8) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorier Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Da sich die durchschnittliche Wurzellänge der von den *PhAOC-RNAi*-Pflanzen geernteten Stecklingen nicht änderte, jedoch die Wurzelanzahl dieser Steckling reduziert war, lies sich vermuten, dass die verringerten Jasmonat-Gehalte in den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Wurzelentwicklung ausüben. Die Ergebnisse könnten eher auf eine Verschiebung des Induktionszeitpunktes hindeuten. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden von den Stecklingen der Kontroll- und *PhAOC-RNAi*-Pflanzen die Anzahl der Primordien in der Wurzelregenerationszone (0,5 cm der Stecklingsbasis) bestimmt. Primordien sind in der Wurzelregenerationszone der Stecklinge von WT-Pflanzen 168 Stunden (sieben Tage) nach der Stecklingsernte nachzuweisen (siehe auch 3.1.2.3, Abbildung 3-6 E). Die Anzahl der Primordien in den Stecklingen der Kontroll- sowie in denen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen wurde deshalb eine Woche nach der Ernte bestimmt. Dabei war zu erkennen, dass hinsichtlich der Primordienanzahl keine signifikanten Unterschiede in den Stecklingen der WT- bzw. der pHell-Pflanzen nachzuweisen waren (Abbildung 3-29 A). Im Vergleich dazu war die Anzahl der Primordien in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen um 70 % (*PhAOC-RNAi*-Linie 10) bis 95 % (*PhAOC-RNAi*-Linie 4 und 15) reduziert. Dieser Effekt war nach einer Bewurzelungsdauer von zwei Wochen nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 3-29 B). Sowohl in den Stecklingen der Kontroll-Pflanzen als auch in denen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen wurden zwei Wochen nach der Stecklingsernte durchschnittlich elf Primordien pro Steckling gezählt. Ein ähnliches Bild zeigte sich nach einer Bewurzelungsdauer von drei Wochen (Abbildung 3-29 C). Hier lag die Anzahl der Primordien in den Stecklingen der Kontroll- und *PhAOC-RNAi*-Pflanzen bei durchschnittlich zehn.

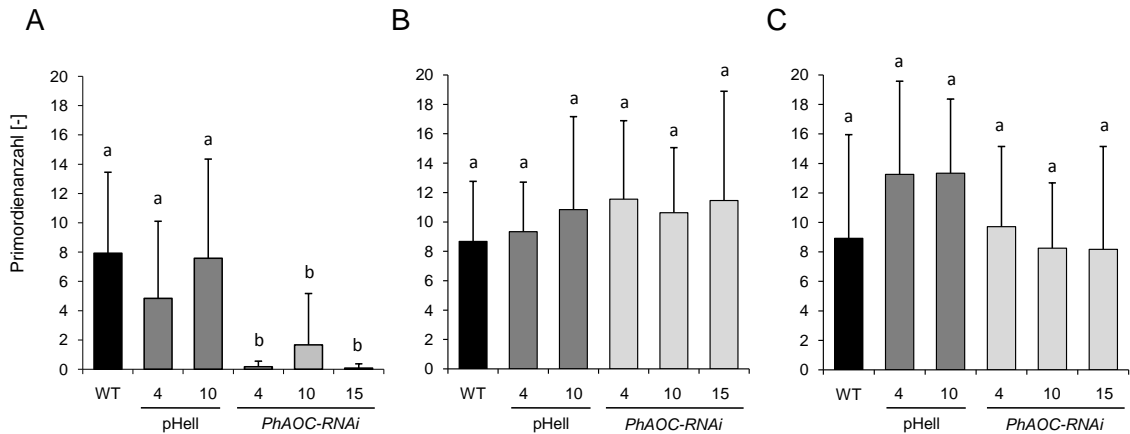


Abbildung 3-29: Die Anzahl der Primordien der von Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien geernteten Stecklinge **A** eine, **B** zwei und **C** drei Wochen nach der Stecklingsernte (siehe 2.10.3). Es wurden jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (WT, pHell: n=4; *PhAOC-RNAi*: n=8) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Fasst man die Anzahl der Primordien sowie die der regenerierten Wurzeln pro Steckling zusammen (Abbildung 3-30), wird deutlich, dass sich, wie bereits vermutet, der Induktionszeitpunkt in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen verschiebt. Nach der ersten Woche waren in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen signifikant weniger Primordien als in denen der Kontroll-Pflanzen nachzuweisen (Abbildung 3-30 A). Die Anzahl der Primordien glich sich jedoch eine Woche später an den Wert der Kontroll-Stecklinge an. Die verzögerte Ausbildung der Primordien spiegelte sich dann in der verminderten Anzahl regenerierter Wurzeln wieder. Dies ist in Abbildung 3-30 B und C nochmals veranschaulicht.

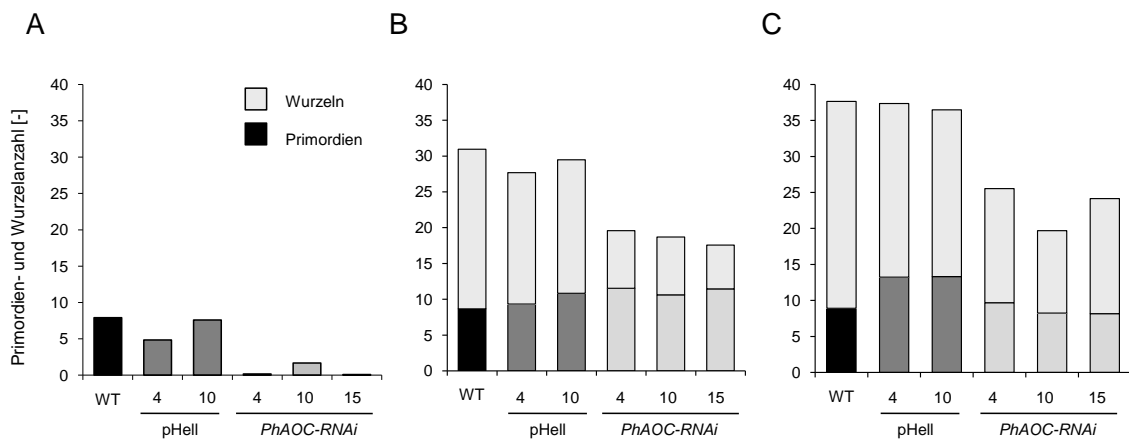


Abbildung 3-30: Die Anzahl der Primordien und der regenerierten Adventivwurzeln der von Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien geernteten Stecklinge **A** eine, **B** zwei und **C** drei Wochen nach der Stecklingsernte. Die dargestellten Daten entsprechen denen der Abbildung 3-27 und Abbildung 3-29 und wurden in jeweils einem Diagramm pro Zeitpunkt zusammengefasst. Auf die Angabe der Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Abbildung verzichtet.

Um sicher zu gehen, dass sich die dargestellten Ergebnisse tatsächlich auf reduzierte Jasmonat-Gehalte in der Wurzelregenerationszone zurückführen lassen, wurden nochmals die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile bestimmt, wobei als Ausgangsmaterial nicht, wie unter 3.3.2.5 beschrieben, vollständige, zuvor verwundete Stecklinge sondern nur die Wurzelregenerationszone der Stecklinge (1 cm von der Stecklingsbasis) 30 Minuten nach der Stecklingsernte für die Analysen verwendet wurden.

Die in Abbildung 3-31 dargestellten Daten bestätigten die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.2.5. In den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen waren die JA- bzw. OPDA-Gehalte im Vergleich zu denen der Kontroll-Pflanzen um bis zu 80 bzw. 90 % reduziert. In Bezug auf die Gehalte von JA-Ile wichen die Ergebnisse von denen in Kapitel 3.3.2.5 ab. Anders als in den vollständigen, zuvor verwundeten Stecklingen waren die JA-Ile-Gehalte in der Wurzelregenerationszone der *PhAOC-RNAi*-Stecklinge in allen drei Linien im Vergleich zu denen der Kontroll-Pflanzen signifikant reduziert. Die JA-Ile-Gehalte fielen in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen um ca. 70 % niedriger aus, als in denen der Kontroll-Pflanzen.

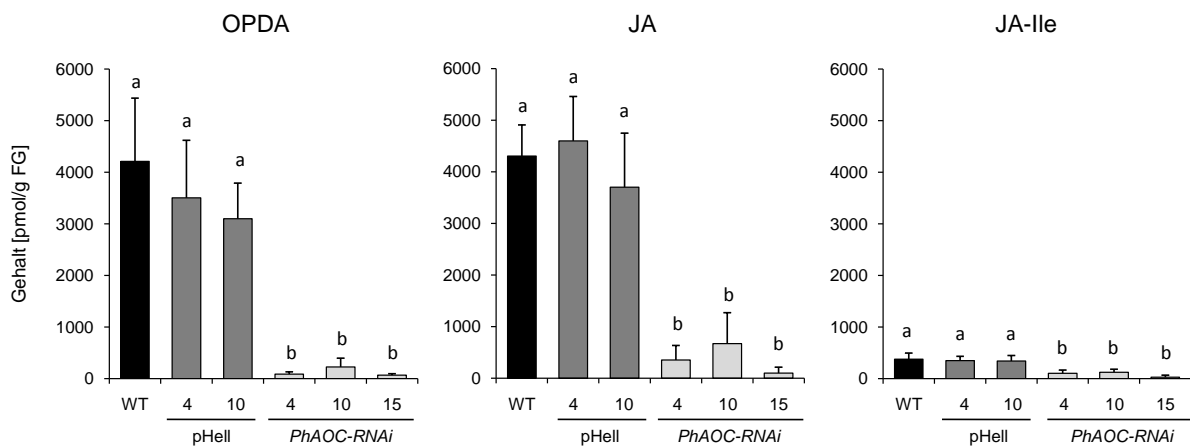


Abbildung 3-31: Die Gehalte an OPDA, JA und JA-Ile in den Pflanzen der *PhAOC-RNAi*-Linien. Die Bestimmung der Gehalte erfolgte wie unter 2.9.8 beschrieben. Pro Pflanze wurde das Material von jeweils drei Stecklingen vereinigt. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (WT, pHell: n=4; *PhAOC-RNAi*: n=8) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Die Ergebnisse der Bewurzelungsexperimente könnten darauf hindeuten, dass geringe Jasmonat-Gehalte in den *PhAOC-RNAi*-Pflanzen den Beginn der Adventivwurzelentwicklung verzögern. Da die Regeneration von Adventivwurzeln durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, ist es eher unwahrscheinlich, dass dieser Effekt allein durch die geringen Jasmonat-Gehalte hervorgerufen wird. Wie bereits erwähnt, spielen die Phytohormone Auxin und Ethylen eine wichtige Rolle in der Adventivwurzelentwicklung. Um mögliche Interaktionen zwischen Jasmonat und Auxin bzw. Ethylen in dieser Phase des Bewurzelungsprozess aufzudecken, wurden die *PhAOC-RNAi*-Pflanzen in Hinblick auf die Gehalte von freier IAA bzw. ACC untersucht. Für diese Analysen wurde ebenfalls nur die Wurzelregenerationszone der Stecklinge als Ausgangsmaterial verwendet.

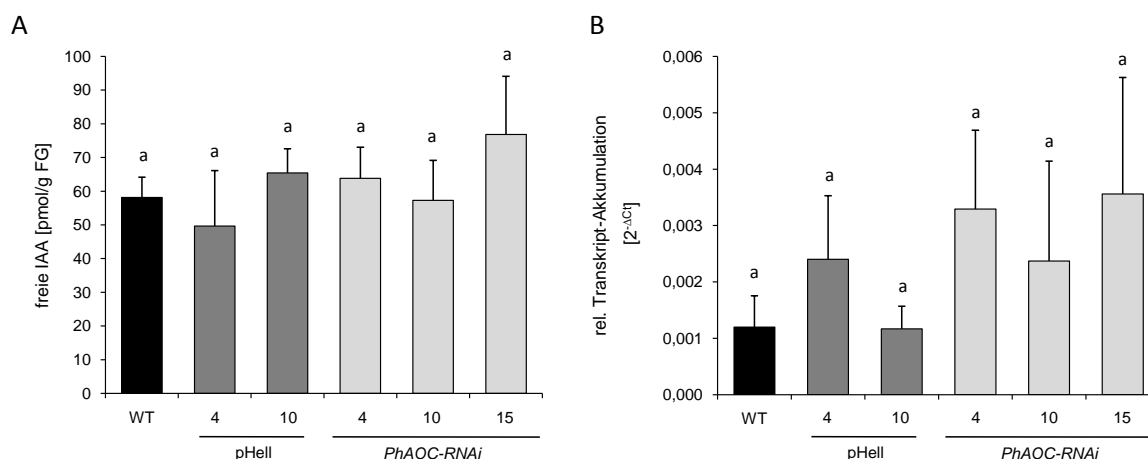


Abbildung 3-32: **A** Der Gehalt von freier IAA (siehe 2.9.9) und **B** die *DevA-20-C01*-Transkript-Akkumulation (CV296522, siehe 2.5.2.8) während der Bewurzelung von Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen. Als Ausgangsmaterial wurde für **A** von je fünf Stecklingen (24 Stunden nach Stecklingsernte) bzw. für **B** von je drei Stecklingen (48 Stunden nach Stecklingsernte) vereinigt Stängelmaterial verwendet. Für die Berechnung der relativen Transkript-Akkumulation diente *RPS13* als Referenz-Gen. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (WT, pHell: n=4; *PhAOC-RNAi*: n=8) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorier Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Die Gehalte von freier IAA in den Stecklingen der WT- bzw. pHell-Pflanzen unterschieden sich nicht. Auch in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen waren im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Abbildung 3-32 A). Dieses Ergebnis wurde durch die Analyse der *DevA-20-C01*-Transkript-Akkumulation (homolog zu einem der *GH3* Familie zugehörigen Gen) gestützt (Abbildung 3-32 B). Das *DevA-20-C01*-Transkript sollte in Reaktion auf einen vermehrten Auxin-Gehalt akkumulieren. Da keine Änderungen im Gehalt der freien IAA in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen nachzuweisen waren, wurden, wie zu erwarten, auch keine signifikanten Unterschiede in der *DevA-20-C01*-Transkript-Akkumulation zwischen Kontroll- und *PhAOC-RNAi*-Pflanzen nachgewiesen.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für die Gehalte der ACC. In den Stecklingen der WT-, pHell- sowie *PhAOC-RNAi*-Pflanzen waren keine signifikanten Änderungen der ACC-Gehalte nachzuweisen (Abbildung 3-33 A). Neben den Gehalten der ACC wurde auch die Transkript-Akkumulation des *PhACO1* Gens untersucht. Das Transkript der *PhACO1* sollte in Reaktion auf einen erhöhten ACC-Gehalt akkumulieren. Zwischen den Stecklingen der WT-, pHell- sowie *PhAOC-RNAi*-Pflanzen wurden keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Akkumulation des *PhACO1*-Transkripts nachgewiesen (Abbildung 3-33 B). Dies war aufgrund der ähnlichen ACC-Gehalte in den Stecklingen der Kontroll- bzw. *PhAOC-RNAi*-Pflanzen zu erwarten.

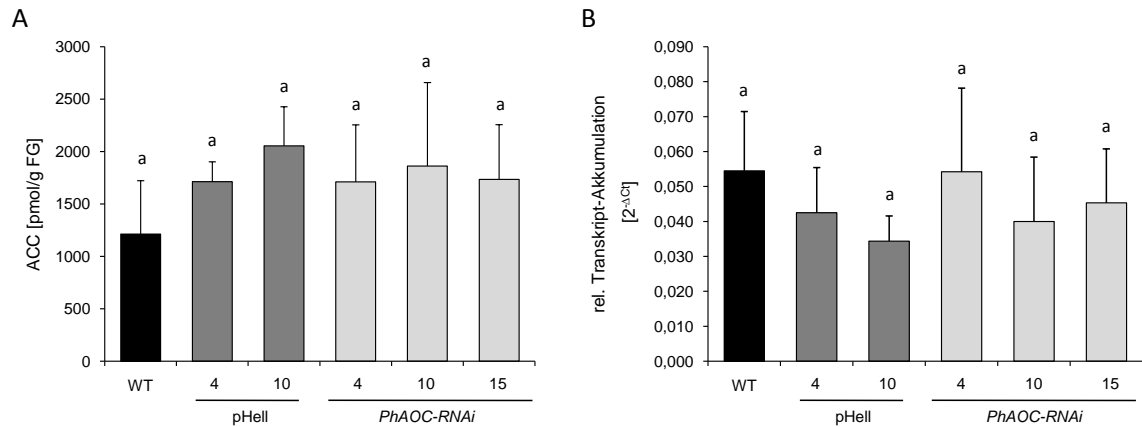


Abbildung 3-33: **A** Der Gehalt der ACC (siehe 2.9.9) und **B** die Transkript-Akkumulation des *PhACO1* Gens (L21976, siehe 2.5.2.8) während der Bewurzelung von Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen. Als Ausgangsmaterial wurde **A** von je fünf Stecklingen (24 Stunden nach Stecklingsernte) bzw. **B** von je drei Stecklingen (48 Stunden nach Stecklingsernte) vereinigt Stängelmaterial verwendet. Für die Berechnung der relativen Transkript-Akkumulation diente *RPS13* als Referenz-Gen. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (WT, pHell: n=4; *PhAOC-RNAi*: n=8) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*One Way ANOVA*) geprüft. Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Anhand der dargestellten Ergebnisse kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Stecklinge der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen weniger Adventivwurzeln ausbilden. Dies ist wahrscheinlich auf eine verzögerte Induktion der Wurzelentwicklung zurückzuführen. Die Verzögerung scheint auf verringerten Jasmonat-Gehalten aber nicht auf einer interagierenden Wirkung von Jasmonat und Auxin bzw. Ethylen zu beruhen, da keine Änderungen der ACC- bzw. IAA-Gehalte in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen nachzuweisen waren.

4 Diskussion

Die Regenerationsfähigkeit bestimmter Pflanzen wird im Garten- und Zierpflanzenbau genutzt, um diese über die Bewurzelung von Stecklingen vegetativ zu vermehren. Aufgrund des Abtrennens der zur Bewurzelung vorgesehenen Seitentriebe von der Mutterpflanze wird diese verwundet. Die daraus resultierende Reaktion der Pflanze hat den Schutz der Selbigen sowie die Heilung des geschädigten Gewebes zum Ziel. In der pflanzlichen Reaktion auf Verwundung kommt der JA und den von ihr abgeleiteten Verbindungen eine wesentliche Funktion zu. Infolge eines Verwundungsreizes akkumulieren Jasmonate im pflanzlichen Gewebe und sind in der Lage, ein breites Spektrum an Abwehrmechanismen zu induzieren. Somit ist davon auszugehen, dass die Jasmonate direkt nach der Ernte von Stecklingen eine Rolle spielen. Die Frage, ob sie auch die nachfolgende Entwicklung der Adventivwurzeln beeinflussen, sollte im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden. So wurden die Jasmonat-Biosynthese betreffende Änderungen für das Modellsystem *Petunia hybrida* untersucht, wobei auftretende Änderungen sowohl direkt nach der Ernte als auch während der Bewurzelung der entsprechenden Stecklinge erfasst wurden. Die durchgeführten Analysen schlossen die endogenen Gehalte der Jasmonate sowie Änderungen in Bezug auf das Schlüsselenzym der Jasmonat-Biosynthese, die AOC, wie deren Vorkommen bzw. deren enzymatische Aktivität, ein. Ferner wurde die cDNA des für die PhAOC kodierenden Gens isoliert und charakterisiert, um auch Aussagen im Hinblick auf eine PhAOC-Transkript-Akkumulation zu ermöglichen.

Die Jasmonat-Biosynthese betreffende Änderungen würden jedoch noch keine Rückschlüsse auf eine Funktion der Jasmonate im Prozess der Wurzelregeneration zulassen. Deshalb wurde zum einen die Wirkung exogen verabreichter Jasmonate auf die Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen untersucht. Andererseits war die Frage zu beantworten, inwiefern die Regeneration von Adventivwurzeln infolge einer modulierten Jasmonat-Biosynthese beeinträchtigt werden kann. Hierfür sollten die Jasmonat-Gehalte in *Petunia* über die AOC mit Hilfe von AOC-sense-Pflanzen erhöht bzw. mit Hilfe von PhAOC-Insertionsmutanten und PhAOC-RNAi-Pflanzen reduziert werden.

(1) DIE AUS *PETUNIA HYBRIDA* ISOLIERTE CDNA KODIERT FÜR EINE AOC.

Die Jasmonate leiten sich von der mehrfach ungesättigten Fettsäure α -Linolensäure ab. Diese wird nach Freisetzung aus der Chloroplasten-Membran durch die Enzyme 13-LOX, AOS und AOC zum biologisch aktiven Intermediat 9(S),13(S)-OPDA umgesetzt. Nach der Reduktion von OPDA durch die OPR3 und dem Durchlaufen von drei Zyklen der β -Oxidation bildet sich 3(R),7(S)-JA, die dann größtenteils zur thermodynamisch stabileren 3(R),7(R)-JA isomerisiert (Schaller und Stintzi, 2009). Durch die enzymatische Aktivität der AOC wird die enantiomere Grundstruktur der natürlich vorkommenden Jasmonate, der 9,13-cis-substituierte Cyclopentanonring, etabliert, weshalb diesem Enzym in der Jasmonat-Biosynthese eine Schlüsselrolle zukommt (Hamberg und Fahlstadius, 1990).

Die im Rahmen dieser Arbeit aus *Petunia hybrida* isolierte cDNA kodiert für eine AOC. Bereits die Sequenzanalyse deutete auf diese Zuordnung hin, da die Übereinstimmung mit den AOCs anderer Spezies hinsichtlich der AS-Sequenz sehr hoch war (siehe auch Abbildung 3-1). Die Gattung *Petunia* sowie die Gattungen *Nicotiana* und *Solanum* (*S. lycopersicum* sowie *S. tuberosum*) sind phylogenetisch eng verwandt und werden gemeinsam in die Familie *Solanaceae* eingeordnet (Olmstead *et al.*, 2008). So überrascht es nicht, dass die PhAOC vor allem den AOCs der *Solanaceae* sehr ähnelte und darum vermutlich in die Unterklasse der *Solanaceae*-AOCs einzugruppieren ist (Stenzel *et al.*, 2003b). Mit Hilfe einer phylogenetischen Analyse müsste dies jedoch genauer untersucht werden.

Ferner zeigte die Analyse der AS-Sequenz auf, dass die für den Katalyse-Mechanismus der AtAOC2 wichtigen AS in der PhAOC-Sequenz konserviert vorlagen und diese somit auch für die Funktionalität der PhAOC von Belang sein könnten. Durch Hofmann *et al.* (2006), Schaller *et al.* (2008) ist mit Hilfe eines Protein-Modells und durch zielgerichtete Mutagenese für die AtAOC2 nachgewiesen, dass die AS Glutaminsäure (Glu23), Asparagin (Asn25) sowie Prolin (Pro32) für die stereoselektive Umsetzung von 12,13(S)-EOT in 9(S),13(S)-OPDA essentiell sind. Nach der korrekten Positionierung des Substrats in der AtAOC2-Bindungstasche induziert der AS-Rest Glu23 durch einen negativen Angriff die Delokalisierung der C15 Doppelbindung und dadurch die Öffnung der Oxiran-Gruppe. Das entstandene Oxy-Anion wird durch ein mit Asn25 und Pro32 interagierendes Wassermolekül und durch π - π -Wechselwirkungen stabilisiert. Eine *trans-cis*-Isomerisierung zwischen C10 und C11 sowie eine *cis-trans*-Isomerisierung zwischen C8 und C9 ermöglichen letzten Endes die Ausbildung einer Bindung zwischen C9 und C13 und somit die Etablierung des Cyclopentanon-Rings (Hofmann *et al.*, 2006; Schaller *et al.*, 2008).

In Abwesenheit der AOC hydrolysiert das instabile 12,13(S)-EOT zu α - und γ -Ketol. Gleichzeitig bildet sich infolge einer spontanen Cyclisierung ein aus 9(S),13(S)- sowie 9(R),13(R)-OPDA bestehendes racemisches Gemisch. Sowohl für die enzymatische als auch für die spontane Cyclisierung ist die Doppelbindung am C15 essentiell (Ziegler *et al.*, 1999; Grechkin *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2006; Schaller *et al.*, 2008). Diese scheint auch für die Spezifität der AOC aus *Petunia* von Bedeutung zu sein. So setzte die rekombinant hergestellte PhAOC im gekoppelten Enzym-Aktivitätstest zusammen mit der AOS neben dem eigentlichen Substrat 13(S)-HPOT nur Substrate um, die ebenfalls diese Doppelbindung aufwiesen, wie zum Beispiel 13(S)-HPOTE, 11(S)-HPHT und 15(S)-HPEP. Eine verkürzte bzw. eine verlängerte Carboxyl-Seitenkette hatte keinen Einfluss auf die Produktbildung. Im Unterschied dazu war für das Substrat 9(S)-HPOT keine enzymatische Umsetzung im gekoppelten Enzym-Aktivitätstest nachzuweisen, trotzdem eine Doppelbindung am C15 vorliegt (siehe auch Anhang, Tabelle 6-9). Dies könnte damit begründet werden, dass, wie bereits für die *Zea mays* (Zm)AOC bzw. die StAOC beschrieben, die Epoxid-Gruppe in n 6,7-Position für die enzymatische Umsetzung des Substrats unerlässlich ist. Befindet sich diese funktionelle Gruppe an einer anderen Position innerhalb des Allenoxids, findet keine enzymatische, sondern nur eine spontane Cyclisierung statt (Ziegler *et al.*, 1999).

Neben dem für den Katalyse-Mechanismus wichtigen konservierten AS wurde mit Hilfe der Sequenzanalyse eine weitere Besonderheit der AOC nachgewiesen. So war es möglich, im N-terminalen Bereich der AS-Sequenz ein putatives Transit-Peptid zu identifizieren. Dieses

müsste den Transfer der PhAOC in die Plastiden ermöglichen. Die Jasmonat-Biosynthese läuft in zwei verschiedenen Zellkompartimenten ab. Während die Umwandlung von α -Linolensäure zu OPDA in den Plastiden erfolgt, finden alle weiteren Schritte des Biosyntheseweges in den Peroxisomen statt. Sowohl die 13-LOX (Feussner und Wasternack, 2002) als auch die AOS (Froehlich *et al.*, 2001; Farmaki *et al.*, 2007) und die AOC wurde immunzytologisch oder mit Hilfe von Import- und Co-Lokalisierungsstudien in den Plastiden lokalisiert (Ziegler *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2003; Stenzel *et al.*, 2003a; Stenzel *et al.*, 2003b; Maucher *et al.*, 2004; Fortes *et al.*, 2005; Isayenkov *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2008). Nachdem im Rahmen dieser Arbeit die spezifische Erkennung der PhAOC durch einen entsprechenden Antikörper nachgewiesen wurde, war es auch für *Petunia* möglich, die mittels Sequenzanalyse vorhergesagte Lokalisierung der AOC in den Plastiden zu bestätigen (siehe auch Abbildung 3-6).

(2) DIE JASMONAT-GEHALTE IN *PETUNIA* WERDEN ÜBER DIE GEWEBE-SPEZIFISCHE VERTEILUNG DER PHAOC UND ÜBER DIE VERFÜGBARKEIT VON SUBSTRAT REGULIERT. EINE REGULATION ÜBER EINE POSITIVE RÜCKKOPPLUNG SCHEINT KEINE ROLLE ZU SPIELEN.

Pflanzen reagieren auf mechanische bzw. durch Herbivoren verursachte Verwundung mit verschiedenen Mechanismen, die die Abwehr sowie die Heilung des geschädigten Gewebes zum Ziel haben. Dabei weist man der JA und den von ihr abgeleiteten Verbindungen eine zentrale Rolle zu. Für verschiedene Pflanzen-Spezies wurde gezeigt, dass Jasmonate infolge einer Verwundungsreaktion vermehrt akkumulieren (Weber *et al.*, 1997; Ziegler *et al.*, 2001; Rakwal *et al.*, 2002; Strassner *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003b) und dadurch eine Reihe von Abwehrmechanismen induziert werden können. Auch in *Petunia* kam es durch das Abtrennen der Seitentriebe von der Mutterpflanze zur Verwundung des pflanzlichen Gewebes, infolgedessen vermehrt OPDA, JA und JA-Ile in den Stecklingen synthetisiert wurde. Dabei erreichten die Gehalte aller drei Verbindungen bereits nach 30 Minuten ein Maximum und fielen nach kurzer Zeit wieder auf das Ausgangsniveau. Den Gehalten der Jasmonate zeitlich nachgelagert akkumulierte das Transkript der *PhAOC* (siehe auch Abbildung 3-4 bzw. Abbildung 3-5). Es ist anzunehmen, dass die Expression des für die PhAOC kodierenden Gens durch die transiente Akkumulation der Jasmonate induziert wurde. Der angesichts eines Verwundungsreizes verursachte Anstieg von Jasmonaten wird oft mit der Transkript-Akkumulation von Genen, die für die Jasmonat-Biosynthese-Enzyme 13-LOX, AOS oder AOC kodieren, in Verbindung gebracht. Und auch die Applikation von Jasmonaten hat eine Akkumulation des Transkripts eben dieser Gene zur Folge (Heitz *et al.*, 1997; Laudert und Weiler, 1998; Maucher *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2001; Ziegler *et al.*, 2001; Stenzel *et al.*, 2003a; Stenzel *et al.*, 2003b; Devoto *et al.*, 2005). Warum, bedingt durch erhöhte Jasmonat-Gehalte, gerade die Expression von 13-LOX, AOS bzw. AOC induziert wird, ist noch nicht vollständig verstanden. Man vermutet, dass die Pflanze versucht, die Kapazität der Jasmonat-Biosynthese zu erhöhen und geht deshalb von einem als positive Rückkopplung bezeichneten Regulationsmechanismus aus (Delker *et al.*, 2006; Wasternack, 2007). Dieser Mechanismus scheint für die Regulation der Abwehr und Wundheilung für das Modell *Petunia* eine

untergeordnete Rolle zu spielen. So wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass das Transkript des für die PhAOC kodierenden Gens direkt nach der Stecklingsernte akkumulierte. Dies hatte aber weder einen Einfluss auf das Proteinvorkommen bzw. auf die in pflanzlichen Proteinrohextrakten enthaltene enzymatische Aktivität der PhAOC, noch war ein weiterer nachfolgender Anstieg im Gehalt der Jasmonate nachzuweisen. Auch für andere Pflanzen-Spezies scheint der Regulationsmechanismus der positiven Rückkopplung keine oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. So führt die Applikation von OPDA bzw. JA in *Zea mays* zu keiner erhöhten enzymatischen Aktivität der AOC (Ziegler *et al.*, 1997) und auch das AOC-Proteinvorkommen in *Arabidopsis thaliana* bleibt unverändert (Stenzel *et al.*, 2003b). Ferner ist die *de novo* Synthese der Jasmonate in *Hordeum vulgare* sowie *Solanum lycopersicum* nicht durch eine Behandlung mit OPDA oder JA induzierbar (Kramell *et al.*, 2000; Miersch und Wasternack, 2000).

Ebenso ist noch nicht ganz klar, wie eine übermäßige Jasmonat-Biosynthese verhindert wird und folglich die endogenen Gehalte in einem für die Pflanze tolerierbaren, nicht-toxischen Bereich gehalten werden. Eine Regulation über die Metabolisierung der JA könnte diesbezüglich eine Rolle spielen. Für *Solanum lycopersicum* ist zum Beispiel gezeigt, dass die Hydroxylierung sowie eine nachfolgende Sulfatierung die biologische Wirksamkeit der Jasmonate beeinträchtigen. So hat eine Applikation von 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA keinen Einfluss auf Wurzelwachstum und Keimungsverhalten (Miersch *et al.*, 2008), obwohl für die Jasmonate Methyl-JA bzw. JA eine inhibierende Wirkung beschrieben ist (Wasternack und Hause, 2002). Ferner wird durch 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA die Expression einer Vielzahl von Genen, die durch Methyl-JA induziert werden können, verhindert. Diese inhibierende Wirkung von 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA betrifft auch Gene, die für an der Jasmonat-Biosynthese beteiligte Enzyme kodieren. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass sowohl 12-OH-JA als auch 12-HSO₄-JA die Signalerkennung der Jasmonate unterbindet und somit einen möglichen Überschuss von Jasmonat in der Pflanze verhindert (Gidda *et al.*, 2003; Miersch *et al.*, 2008). Diese Art der Regulation wäre auch für *Petunia* denkbar. So stiegen die Gehalte der 12-OH-JA denen der biologisch aktiven Jasmonate OPDA, JA und JA-Ile in den *Petunia*-Stecklingen zeitlich nachgelagert an. Das PhAOC-Transkript akkumulierte ebenso vor dem Anstieg der 12-OH-JA-Gehalte und erreichte zeitgleich mit diesem wieder das Ausgangsniveau (siehe auch Abbildung 3-4 bzw. Abbildung 3-5). Die zeitliche Abfolge der Veränderungen könnte ein erster Hinweis für einen solchen Regulationsmechanismus sein. Ob die Gehalte der biologisch aktiven Jasmonate in *Petunia* tatsächlich über die Hydroxylierung bzw. die nachfolgende Sulfatierung reguliert werden oder ob noch andere Mechanismen regelnd eingreifen, kann anhand der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse nicht beantwortet werden und bedarf weiterer Analysen.

Dagegen ist der Sachverhalt, dass die Wirkung der Jasmonate über deren spezifische Verteilung in den verschiedenen pflanzlichen Geweben reguliert wird, hinreichend beschrieben. So variieren die Gehalte an OPDA, JA sowie der von der JA abgeleiteten Verbindungen zum Teil beträchtlich und auch das Verhältnis der einzelnen Signalmoleküle zueinander scheint für die verschiedenen pflanzlichen Gewebe charakteristisch zu sein (Creelman und Mullet, 1995; Miersch *et al.*, 2004; Genzano *et al.*, 2005; Miersch *et al.*, 2008). Man nimmt an, dass infolge dieser als Oxylipin- bzw. Jasmonat-Signatur (Weber *et al.*, 1997; Hause *et al.*, 2000; Miersch *et al.*, 2008) bezeichneten

spezifischen Verteilung pflanzliche Entwicklungsprozesse, wie das Wachstum von Keimlingen (Creelman und Mullet, 1995; Hause *et al.*, 2003b), die Blütenentwicklung (Hause *et al.*, 2000; Hause *et al.*, 2003b) sowie die Entwicklung von Knollen (Cenzano *et al.*, 2005) gesteuert werden. Die relativen Gehalte der Jasmonate verhalten sich dabei dynamisch (Weber *et al.*, 1997) und können durch wechselnde Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel osmotischen Stress (Kramell *et al.*, 1995) oder veränderte Lichtverhältnisse (Helder *et al.*, 1993), variieren. Eine durch Verwundung oder durch Pathogen-Infektion bedingte Schädigung der Pflanze hat indes umfangreichere Änderungen hinsichtlich der Oxylipin- bzw. Jasmonat-Signatur zur Folge (Weber *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1999; Vollenweider *et al.*, 2000; Miersch *et al.*, 2008). Wie bereits erwähnt, konnten auch im Rahmen dieser Arbeit eine durch Verwundung bedingte vermehrte Akkumulation von Jasmonaten nachgewiesen werden. In den von der Mutterpflanze vollständig abgetrennten Stecklingen stiegen die Jasmonat-Gehalte in der Basis der Stecklinge und somit in unmittelbarer Nähe zur Verwundungsstelle transient an. Wie die Jasmonate in den verschiedenen Geweben und Organen von *Petunia* verteilt sind und wie sich die Oxylipin- bzw. Jasmonat-Signatur infolge eines Verwundungsreizes ändert, ist noch nicht untersucht. Es ist aber wahrscheinlich, dass Ähnlichkeiten bezüglich der spezifischen Verteilung zu anderen pflanzlichen Systemen bestehen. Grund für die Annahme ist, dass die Jasmonat-Gehalte in den verschiedenen Geweben über das Vorkommen der an der Jasmonat-Biosynthese beteiligten Enzyme 13-LOX, AOS und AOC reguliert werden (Hause *et al.*, 2000; Hause *et al.*, 2000; Cenzano *et al.*, 2005; Cenzano *et al.*, 2007). So wurde in der vorliegenden Arbeit und in der durch Frau Daniela Kleen angefertigten Diplomarbeit (Kleen, 2007) gezeigt, dass die AOC, wie auch für *Solanum lycopersicum* (Hause *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* (Isayenkov *et al.*, 2005) und *Pharbitis nil* (Kong *et al.*, 2009) beschrieben, in Organen der Blüte und in der Wurzel sowie im Leitgewebe von Blatt und Stängel lokalisiert ist. Das bevorzugte Vorkommen der AOC im Leitgewebe ist möglicherweise für die zu bewurzelnden *Petunia*-Strecklinge bedeutsam. In *Solanum lycopersicum* sind die Jasmonat-Biosynthese-Enzyme LOX, AOS und AOC ebenfalls im Leitgewebe lokalisiert (Hause *et al.*, 2000; Hause *et al.*, 2003a), weshalb die Synthese der Jasmonate zunächst dort stattfindet, bevor eine Verteilung ins angrenzende Gewebe oder ein Transport über das Phloem erfolgt (Stenzel *et al.*, 2003a; Mielke *et al.*, 2011).

In unbehandelten bzw. unverwundeten Gewebe von *Petunia* konnten jedoch trotz des konstitutiven Vorkommens der AOC nur sehr geringe Mengen von Jasmonaten nachgewiesen werden. Erst durch den infolge der Ernte hervorgerufenen Verwundungsreiz akkumulierten OPDA, JA, JA-Ile sowie 12-OH-JA im Stängelgewebe der Stecklinge. Dieser Mechanismus der Regulation ist auch für *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Ohne Stimulus sind nur geringe Jasmonat-Gehalte in der Pflanze nachzuweisen und dass obschon die an der Jasmonat-Biosynthese beteiligten Enzyme in den entsprechenden Geweben dauerhaft und gleichmäßig vorkommen (Laudert und Weiler, 1998; Stenzel *et al.*, 2003b). Auch in transgenen *Nicotiana tabacum*-, *Solanum lycopersicum*- bzw. *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die für die Jasmonat-Biosynthese wichtige Enzyme wie AOS oder AOC konstitutiv überexprimieren, akkumulieren die Jasmonate nur nach einem Stimulus vermehrt (Wang *et al.*, 1999; Laudert *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Stenzel *et al.*, 2003a). Aus diesem Grund geht man davon aus, dass die Jasmonat-Gehalte in der Pflanze über die Verfügbarkeit des Substrats reguliert sind. Das heißt, erst nach der durch einen Stimulus be-

dingten Freisetzung der α -Linolensäure aus der Chloroplasten-Membran wird diese zu OPDA, JA und von der JA abgeleiteten Verbindungen umgesetzt.

(3) DER BEWURZELUNGSPROZESS VON *PETUNIA*-STECKLINGEN KANN IN DREI AUF EINANDERFOLGENDE PHASEN UNTERTEILT WERDEN.

Die Regeneration von Adventivwurzeln ist ein Entwicklungsprozess, der in verschiedene aufeinanderfolgende Phasen unterteilt wird. So nehmen Jarvis (1986), Hausman *et al.* (1997) und Kevers *et al.* (1997) eine Einteilung in Induktions-, Initiations- sowie Expressions- bzw. Wachstumsphase vor. Für das Modellsystem *Petunia* konnte ebenfalls von drei aufeinanderfolgenden Phasen ausgegangen werden, da in den Querschnitten der Wurzelregenerationszone keine vorgebildeten Primordien nachzuweisen waren. Stecklinge der Gattungen *Populus* oder *Salix* besitzen bereits vorgebildete, ruhende Primordien, sodass die Induktionsphase entfällt und sich somit die Dauer des Bewurzelungsprozesses verkürzt (Lovell und White, 1986). Mit den in dieser Arbeit erfassten morphologischen Änderungen in der Wurzelregenerationszone der *Petunia*-Stecklinge war zwar eine Einteilung in die durch Jarvis (1986), Hausman *et al.* (1997) und Kevers *et al.* (1997) beschriebenen Phasen möglich (siehe auch Abbildung 3-6), eine genaue zeitliche Einordnung konnte jedoch nur unter Zuhilfenahme der Arbeit von Klopotek *et al.* (2010) erfolgen. So umfasste die erste als Induktion bezeichnete Phase in *Petunia*-Stecklingen 48 Stunden und war dadurch charakterisiert, dass diverse biochemische aber noch keine morphologischen Änderungen nachgewiesen werden konnten. Der Induktionsphase schloss sich die Initiation an. In dieser von 48 bis 144 Stunden dauernden Phase bildeten sich Meristemoide und Primordien aus. Letztere differenzierten während der Expressions- bzw. Wachstumsphase zu Adventivwurzeln aus, die zunächst innerhalb des Stängels wuchsen und nach neun Tagen außerhalb des Stecklings sichtbar wurden. Die Dauer von der Ernte der Stecklinge bis zur ersten nachweisbaren Zellteilung ist mit zu bewurzelnden Stecklingen anderer krautiger Pflanzen, wie zum Beispiel *Solanum lycopersicum* (Maldiney *et al.*, 1986), *Pisum sativum* (Bollmark *et al.*, 1988), *Vigna radiata* (Chibbar *et al.*, 1978) bzw. *Phaseolus vulgaris* (Brunner, 1978), vergleichbar, obwohl die Dauer des gesamten Bewurzelungsprozesses in den genannten pflanzlichen Systemen mit fünf Tagen kürzer ausfällt als in *Petunia*. Da die Stecklinge der verschiedenen Spezies nicht unter einheitlichen experimentellen Bedingungen bewurzelt wurden, ist ein Vergleich nur bedingt möglich. Ein Grund für die unterschiedlich lange Bewurzelungsdauer könnte sein, dass für die aufgeführten Beispiele ausschließlich Stecklinge von Keimlingen Verwendung fanden und im Rahmen dieser Arbeit Stecklinge ausgewachsener Pflanzen bewurzelt wurden. Der Aspekt, dass juveniles Pflanzenmaterial besser bewurzelt als adultes und dass somit das physiologische Alter des zu bewurzelnden Materials für die Regeneration von Adventivwurzeln nicht unerheblich zu sein scheint, ist bereits durch Untersuchungen zur Bewurzelungsfähigkeit von *Rhododendron*-, *Lunaria*- sowie *Acacia*-Stecklingen belegt (Pierik, 1972; Pierik und Steegmans, 1975; Marx, 2003).

(4) AUXIN UND ETHYLEN FÖRDERN DIE REGENERATION VON ADVENTIVWURZELN IM MODELLSYSTEM *PETUNIA*

Die Regeneration von Adventivwurzeln und somit die erfolgreiche Bewurzelung von Stecklingen hängt von einer Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren ab. Um den Einfluss exogener Faktoren so gering wie möglich zu halten, wurden die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in Klimakammern mit konstanten Umgebungsbedingungen (Temperatur, Lichtbedingungen, Substrat und Feuchtigkeit) durchgeführt. Somit war davon auszugehen, dass hauptsächlich endogene Faktoren, wie die Gehalte von Phytohormonen sowie die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten, Makro- und Mikronährstoffen, die Bewurzelung der Stecklinge beeinflussen. Dem Phytohormon Auxin kommt eine zentrale Funktion im Bewurzelungsprozess zu. So führt eine Applikation von Auxinen zur lokalen Initiation von Adventivwurzeln an Stängeln und Blättern bzw. fördert die Ausbildung von Adventivwurzeln an zu bewurzelnden Stecklingen. Eine fördernde Wirkung wurde auch für die *Petunia*-Stecklinge nachgewiesen. Infolge einer Auxin-Applikation regenerierten in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration mehr Adventivwurzeln, als dies ohne zusätzliche Behandlung zu beobachten war. Die Art des verwendeten Auxins spielte dabei keine Rolle. Sowohl IAA und IBA als auch das synthetische Auxin 2,4-D förderten die Wurzelregeneration in ähnlicher Weise (siehe auch Abbildung 3-11 bzw. Abbildung 6-5). Dieses Ergebnis wich von einigen in der Literatur dargestellten ab. So ist nachgewiesen, dass eine Behandlung mit geringen IAA-Konzentrationen die Bewurzelung von Stecklingen beeinträchtigt und dass die Auxine IBA und 2,4-D die Bewurzelung effektiver fördern als IAA (Eliasson, 1981; James, 1983; Eliasson und Areblad, 1984; Nordström und Eliasson, 1984; Nordström *et al.*, 1991; Ludwig-Müller *et al.*, 2005). Auch eine zu lange währende Auxin-Applikation kann die Regeneration von Adventivwurzeln inhibieren (Jarvis *et al.*, 1983). Dies schien für die Bewurzelung der *Petunia*-Stecklinge ebenfalls unerheblich zu sein, da sich eine Auxin-Applikation über den gesamten Zeitraum der Bewurzelung gleichwohl stimulierend auf die Wurzelregeneration auswirkte. Vermutlich lassen sich die abweichenden Befunde auf verschiedenartige experimentelle Bedingungen zurückführen. So wurden zwar in den einzelnen Untersuchungen ähnliche Mengen der entsprechenden Auxine appliziert, indes variieren in der Literatur das Bewurzelungsmedium sowie die Lichtverhältnisse, was die Stabilität vor allem der natürlichen Auxine IAA und IBA beeinträchtigen kann (Stasinopoulos und Hangarter, 1990; Nordström *et al.*, 1991). Ebenso besteht die Möglichkeit, dass Aufnahme, Transport und Metabolisierung des Auxins in den Stecklingen der verschiedenen Spezies nicht identisch ablaufen, sodass die endogenen Gehalte und somit auch die Wirkung des Auxins variieren würden.

Aber auch ohne eine zusätzliche Gabe von Auxin können Stecklinge verschiedener Pflanzenspezies Adventivwurzeln ausbilden, was darin begründet liegt, dass die zu bewurzelnden Stecklinge nach ihrer Ernte ausreichende Mengen von Auxin in Blättern, Knospen und im apikalen Bereich synthetisieren können. Das gebildete Auxin wird sodann in die Wurzelregenerationszone transportiert und akkumuliert dort vermehrt bis zur Ausbildung erster Primordien. Während die Primordien zu Adventivwurzeln ausdifferenzieren, sind die Auxin-Gehalte in den Stecklingen der verschiedenen Spezies niedrig (Brunner, 1978; Gaspar *et al.*, 1990; Koukourikou-Petridou und Bangerth, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Auxin in den *Petunia*-

Stecklingen ebenfalls transient akkumulierte, wobei die freie IAA zwei und 24 Stunden nach der Ernte Maximalwerte erreichte. Die Analyse der Transkript-Akkumulation eines Auxin-induzierbaren Gens (*DevA-20-C01*) bestätigte dies. In Stecklingen von *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum* oder *Phaseolus vulgaris* steigen die Gehalte an freier IAA nur einmalig nach der Ernte der Stecklinge an. Da man die IAA-Gehalte in den Stecklingen der erwähnten Spezies frühestens 24 Stunden nach der Stecklingsernte ermittelte, ist nicht auszuschließen, dass ein zeitiger Anstieg direkt nach der Ernte stattfindet, dieser aber nicht erfasst wurde. Der zeitige Anstieg der IAA in den *Petunia*-Stecklingen könnte aus dem durch die Ernte verursachten Verwundungsreiz resultieren. So wurde zum Beispiel für *Solanum tuberosum* nachgewiesen, dass freie IAA infolge einer mechanischen Verwundung akkumuliert (Fabbri *et al.*, 2000; Reverberi *et al.*, 2005). Durch welche Mechanismen bzw. durch welche Signalstoffe die Auxin-Biosynthese dabei induziert wird, ist noch nicht bekannt, eine Regulation über die Jasmonate wäre jedoch denkbar (siehe auch Punkt(5)).

Obwohl anhand der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse nicht geklärt werden kann, welcher der beiden IAA-Maxima die Adventivwurzelentwicklung in den *Petunia*-Stecklingen induziert, ist für die Induktion mindestens ein transienter Anstieg unabdingbar. Sind die endogenen Auxin-Gehalte in der Wurzelregenerationszone zu niedrig, regenerieren weniger oder keine Wurzeln (Liu und Reid, 1992a; Koukourikou-Petridou und Bangerth, 1997; Garrido *et al.*, 2002; Ludwig-Müller *et al.*, 2005). Dies konnte auch für *Petunia* durch die Anwendung von Inhibitoren, die den polaren Auxin-Transport unterbinden und dadurch die spezifische Verteilung des Auxins in der Stecklingsbasis beeinträchtigen, bestätigt werden. So regenerierten an mit NPA bzw. TIBA behandelten *Petunia*-Stecklingen deutlich weniger Adventivwurzeln als an den Unbehandelten (siehe auch Abbildung 3-16 bzw. Abbildung 6-8). Anders verhielt es sich im Hinblick auf das Auxin-Analogon PCIB, dessen Wirkung auf eine kompetitive Hemmung des Auxin-Rezeptors zurückzuführen ist (MacRae und Bonner, 1953; Oono *et al.*, 2003). Eine PCIB-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Bewurzelung der *Petunia*-Stecklinge. Da in Bezug auf die Entwicklung von Adventivwurzeln bisher keine Daten zur Wirkung von PCIB vorliegen, kann nur vermutet werden, dass die verwendeten Konzentrationen nicht optimal gewählt waren.

Neben Auxin beeinflusst auch Ethylen die Regeneration von Adventivwurzeln. Allerdings wird die Ethylen-Wirkung in Bezug auf die gezielte Bewurzelung von Stecklingen in der Literatur konträr diskutiert (siehe 1.2.2.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zu bewurzelnden *Petunia*-Stecklinge nicht direkt mit Ethylen behandelt, sondern es fanden die Ethylen-freisetzenden Substanzen Ethepon bzw. ACC Verwendung. Trotzdem für beide Substanzen ein ähnliches Wirkungsspektrum beschrieben ist, förderte ACC die Wurzelregeneration in Abhängigkeit von der Konzentration und Ethepon zeigte wider Erwarten keine Wirkung (siehe auch Abbildung 3-13 bzw. Abbildung 6-6). Um dieses unerwartete Ergebnis bewerten zu können, wäre es erforderlich, den tatsächlichen Umfang der durch die ACC bzw. Ethepon-Behandlung bedingten Ethylen-Freisetzung zu ermitteln. Die in den *Petunia*-Stecklingen nachgewiesene konzentrationsabhängige Wirkung der ACC ist auch für *Vigna radiata* (Riov und Yang, 1989), *Picea abies* (Bollmark und Eliasson, 1990) oder *Helianthus annuus* (Liu *et al.*, 1990) beschrieben, wobei die applizierten ACC-Mengen mit denen der in dieser Arbeit verwendeten vergleichbar waren. Eine Ausnahme

bilden die *Helianthus annuus*-Stecklinge. Hier regenerieren nur nach einer Gabe sehr geringer ACC-Konzentrationen vermehrt Adventivwurzeln. Höhere Konzentrationen wirken sich inhibierend aus (Liu *et al.*, 1990). Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Empfindlichkeit gegenüber Ethylen in den verschiedenen Spezies variiert. Aber auch die endogenen Auxin-Gehalte scheinen für die beschriebene stimulierende Wirkung der ACC nicht ganz unerheblich zu sein. So regenerieren an *Helianthus annuus*-Stecklingen nach einer ACC-Applikation vermehrt Adventivwurzeln. Werden jedoch die Auxin-synthetisierenden Organe des Stecklings entfernt und vermindern sich dadurch die endogenen Auxin-Gehalte, können keine Adventivwurzeln mehr regenerieren (Liu *et al.*, 1990; Liu und Reid, 1992b). Aufgrund der Daten aus der Literatur liegt die Vermutung nahe, dass die in dieser Arbeit untersuchten *Petunia*-Stecklinge ausreichende Mengen Auxin synthetisieren, sodass trotz ACC-Applikation ein günstiges Verhältnis Auxin zu Ethylen besteht.

Aber auch ohne zusätzliche Applikation von Ethylen-freisetzenden Substanzen kann Ethylen den Bewurzelungsprozess über die endogenen Gehalte beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurden in den *Petunia*-Stecklingen die Gehalte des freigesetzten Ethylens nicht direkt, sondern indirekt über die ACC bestimmt. Die ACC-Gehalte stiegen in den Stecklingen kurz nach der Ernte an und erreichten nach 24 Stunden einen Maximalwert. In den Stecklingen anderer Spezies akkumuliert Ethylen ebenfalls einmalig direkt nach der Stecklingsernte (Coleman *et al.*, 1980; Bollmark und Eliasson, 1990; Liu *et al.*, 1990). Der transiente Anstieg der ACC in den *Petunia*-Stecklingen wurde durch die Transkript-Akkumulation eines durch Ethylen induzierbaren Gens (*PhAOC1*) bestätigt. Diesbezüglich fiel jedoch auf, dass das Transkript bereits vor dem ACC-Anstieg schon einmal akkumulierte, obgleich der erste Anstieg nicht so ausgeprägt war wie der zweite. Dies könnte auf eine zweite frühere Akkumulation des Ethylens hindeuten, obwohl kein zweiter Anstieg der ACC-Gehalte in den *Petunia*-Stecklingen nachzuweisen war. In einer Vielzahl von Untersuchungen korrelieren die ermittelten Gehalte der ACC mit denen des freigesetzten Ethylens (Bufler *et al.*, 1980; Apelbaum und Yang, 1981; Riov und Yang, 1982; Belles *et al.*, 1989; Hong *et al.*, 2004). Es gibt aber auch Hinweise dafür, dass dies nicht immer zutrifft. So sinken zum Beispiel die ACC-Gehalte in *Helianthus annuus*-Stecklingen, trotzdem eine vermehrte Ethylen-Freisetzung nachgewiesen ist (Liu *et al.*, 1990). Aufgrund dieser Diskrepanz wäre eine direkte Bestimmung der endogenen Ethylen-Gehalte in den *Petunia*-Stecklingen angeraten. Ferner sollte die Transkript-Akkumulation eines anderen durch Ethylen induzierbaren Gens, wie zum Beispiel ACS (Swarup *et al.*, 2008) bzw. *ETR1* (*ETHYLENE RESPONSE 1*, Wilkinson *et al.*, 1995), untersucht werden, um den zweimaligen Anstieg des *PhACO1*-Transkripts zu bestätigen.

Der transiente Anstieg der ACC bzw. des Ethylens scheint für die Regeneration von Adventivwurzeln unerlässlich zu sein. Wird die Ethylen-Biosynthese oder die Ethylen-Wirkung durch die Verwendung geeigneter Inhibitoren unterbunden, regenerieren zum Beispiel *Corylus avellana*-, *Helianthus annuus*-, *Oryza sativa*- sowie *Vigna radiata*-Stecklinge weniger Adventivwurzeln (Robbins *et al.*, 1983; Jusaitis, 1986; Liu *et al.*, 1990; Gonzalez *et al.*, 1991; Lorbiecke und Sauter, 1999). Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch für die *Petunia*-Stecklinge gezeigt werden. So bildeten diese infolge einer AVG bzw. STS-Behandlung weniger Adventivwurzeln aus als die unbehandelten Stecklinge (siehe auch Abbildung 3-15 bzw. Abbildung 6-7). Ein Grund für die Wirkung der Inhibitoren könnte sein, dass durch die Einschränkung von Ethylen-

Biosynthese bzw. Ethylen-Wirkung die Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber endogenem bzw. exogenem Auxin beeinträchtigt wird. Die reduzierte Auxin-Empfindlichkeit bewirkt wiederum, dass das Vermögen der Stecklinge, Adventivwurzeln zu regenerieren, abnimmt (Robbins *et al.*, 1983; Robbins *et al.*, 1985; Jusaitis, 1986; Liu und Reid, 1992b; Visser *et al.*, 1996; Smalle und Straeten, 1997). Eine reduzierte Auxin-Empfindlichkeit kann auch durch eine gestörte Ethylen-Erkennung bedingt sein (Shibuya *et al.*, 2004; Negi *et al.*, 2010). So konnte Clark *et al.* (1999) zeigen, dass Stecklinge von Ethylen-unempfindlichen transgenen *Petunia*-Pflanzen keine oder nur vereinzelt Adventivwurzeln regenerieren und dies auch nicht durch eine Applikation von Auxin geändert werden kann.

Somit konnte mit Hilfe der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse für die Modell-Pflanze *Petunia* bestätigt werden, dass sowohl Auxin als auch Ethylen die Regeneration von Adventivwurzeln fördern und dass beide Phytohormone in bestimmten Mengen in den Stecklingen vorliegen müssen, um diese erfolgreich zu bewurzeln. Aber nicht nur die Regeneration der Wurzeln an sich, sondern auch das Längenwachstum der Adventivwurzeln wird durch beide Phytohormone beeinflusst. So hatte eine Behandlung der *Petunia*-Stecklinge mit Auxin bzw. Ethylen-freisetzenden Substanzen eine Verminderung der durchschnittlichen Wurzellänge zur Folge. Diese inhibierende Wirkung ist sowohl für das Längenwachstum von Primär- als auch für das von Adventivwurzeln beschrieben (Krishnamoorthy, 1970; Riov und Yang, 1989). Die genaue Wirkung beider Phytohormone auf das Längenwachstum ist jedoch lediglich für Primärwurzeln ausführlich untersucht, obgleich eine ähnliche Regulation in den Adventivwurzeln möglich erscheint. Bei Verwendung von sehr niedrigen Auxin-Konzentrationen wird das Längenwachstum von Primärwurzeln gefördert (Dubucq *et al.*, 1978). Höhere Konzentrationen wirken unabhängig von der Art des verwendeten Auxins stets inhibierend (Krishnamoorthy, 1970; Rauser und Horton, 1975; Dubucq *et al.*, 1978; Zolman *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2001; Woodward und Bartel, 2005; Ruzicka *et al.*, 2007). So beeinträchtigt eine Auxin-Applikation die vertikale und fördert die horizontale Zellausdehnung, sodass die Wurzelspitzen anschwellen und das Längenwachstum stagniert (Aberg, 1957; Chadwick und Burg, 1967; Rauser und Horton, 1975; Eliasson *et al.*, 1989; Rahman *et al.*, 2001; Ruzicka *et al.*, 2007). Anfangs vermutete man, dass Ethylen die Auxin-Wirkung vermittelt. Die durch Auxin induzierte Freisetzung des Ethylens korreliert in Bezug auf Geschwindigkeit und Ausmaß jedoch nicht mit der Reduktion der Wurzelwachstumsrate (Bucher und Pilet, 1983), sodass man von einer direkten Wirkung des Auxins ausgeht (Eliasson *et al.*, 1989). Die infolge einer Ethylen-Behandlung verminderte Wachstumsrate der Wurzeln (Chadwick und Burg, 1967; Krishnamoorthy, 1970; Negi *et al.*, 2008) wird indes nicht direkt über Ethylen, sondern über die Biosynthese und die Signalwirkung des Auxins vermittelt (Burg und Burg, 1967; Rauser und Horton, 1975; Konings und Jackson, 1979; Eliasson *et al.*, 1989; Riov und Yang, 1989; Le *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2001; Stepanova *et al.*, 2005; Stepanova *et al.*, 2007). So stimuliert Ethylen die Biosynthese und den basipetalen Transport des Auxins, wodurch dieses im meristematischen Gewebe der Wurzelspitze akkumuliert. Dies führt wiederum zur Inhibierung des Längenwachstums. Analog dazu hat Ethylen in Mutanten, welche in der Auxin-Erkennung bzw. im basipetalen Auxin-Transport gestört sind, keinen Einfluss auf die endogenen Gehalte des Auxins in der Wurzel und beeinflusst somit auch nicht deren Längenwachstum (Ruzicka *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2007).

(5) EINE BEHANDLUNG VON *PETUNIA*-STECKLINGEN MIT JASMONSÄURE BEEINTRÄCHTIGT DIE REGENERATION VON ADVENTIVWURZELN UND INHIBIERT DEREN LÄNGENWACHSTUM

Eine Wirkung von Jasmonaten im Prozess der Adventivwurzelentwicklung ist bisher kaum untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe von pharmakologischen Experimenten gezeigt werden, dass Jasmonate diesen pflanzlichen Entwicklungsprozess beeinträchtigen. So regenerierten an mit Jasmonaten behandelten *Petunia*-Stecklingen weniger oder keine Adventivwurzeln und auch die durchschnittliche Länge der regenerierten Wurzeln war infolge der Jasmonat-Behandlung reduziert (siehe auch Abbildung 3-9 bzw. Abbildung 3-10). Der Aspekt, dass Jasmonate das Längenwachstum an sich und im Speziellen das von Wurzeln inhibieren, ist bereits in einer Vielzahl von Untersuchungen beschrieben (Yamane *et al.*, 1981; Tung *et al.*, 1996; Moons *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002b; Toro *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2009) und resultiert aus morphologischen Veränderung, wie dem Integritätsverlust des meristematischen Gewebes, einer verminderten Zellteilungsrate sowie der Inhibierung der Zellstreckung (Tung *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2007). Andererseits kann das Wurzellängenwachstum bei Verwendung niedriger Jasmonat-Konzentrationen gefördert werden (Tung *et al.*, 1996; Pelacho *et al.*, 1997; Toro *et al.*, 2003). Diese von der Jasmonat-Konzentration abhängige Wirkung ist auch für die Initiation und Entwicklung von Lateralwurzeln beschrieben (Tung *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002b; Toro *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2009) und auch in einigen wenigen Untersuchungen konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung von Jasmonaten in Bezug auf die Regeneration von Adventivwurzeln nachgewiesen werden. So inhibieren höhere Jasmonat-Konzentrationen (mikromolarer Bereich) die Bewurzelung von *Oryza sativa*- bzw. *Brassica oleracea*-Stecklingen, andererseits wirken sich geringe Mengen (nano bzw. niedriger mikromolarer Bereich) förderlich auf die Wurzelregeneration aus (Moons *et al.*, 1997). Die fördernde Wirkung der Jasmonate konnte für die *Petunia*-Stecklinge im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, trotzdem für die pharmakologischen Experimente ähnliche Konzentrationen zur Anwendung kamen, wie die in der Literatur angegebenen. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Empfindlichkeit gegenüber Jasmonaten in den verschiedenen Spezies variiert.

In Bezug auf die Bewurzelung der *Petunia*-Stecklinge ist für den beschriebenen inhibierenden Effekt eine direkte aber auch eine indirekte Wirkung der Jasmonate denkbar. Wie bereits unter Punkt (2) diskutiert, werden die endogenen Gehalte der Jasmonate durch verschiedene Regulationsmechanismen beeinflusst. Die dadurch bewirkte spezifische Verteilung in den entsprechenden Geweben ist für eine Vielzahl von pflanzlichen Entwicklungsprozessen von Bedeutung. Größere Abweichungen der endogenen Jasmonat-Gehalte könnten somit die Entwicklung bzw. das Wachstum der Pflanze beeinträchtigen. Dieser Aspekt ist bereits für andere an der Adventivwurzelentwicklung beteiligte Phytohormone wie Auxin, Ethylen und Cytokinin beschrieben. So fördert eine Behandlung mit hohen Auxin-Konzentrationen die Bewurzelung von Stecklingen und niedrige endogene Gehalte wirken sich inhibierend aus. Umgekehrt begünstigen geringe Ethylen- bzw. Cytokinin-Konzentrationen den Bewurzelungsprozess und hohe Konzentrationen hemmen diesen. Aber nicht nur die endogenen Gehalte der Phytohormone an sich, sondern auch die Verhältnisse der einzelnen Phytohormone untereinander beeinflussen die Stecklingsbewurzelung.

So ist zum Beispiel ein Verhältnis viel Auxin zu wenig Cytokinin bzw. viel Auxin zu wenig Ethylen für die Regeneration von Adventivwurzeln von Bedeutung (siehe auch 1.2.2). Und so könnte auch ein feinabgestimmtes Verhältnis von Jasmonat zu Auxin bzw. Ethylen für die Adventivwurzelentwicklung eine Rolle spielen. Da Jasmonate, ähnlich wie Cytokinin oder Ethylen, scheinbar inhibierend wirken, liegt die Vermutung nahe, dass ein Verhältnis viel Auxin zu wenig Jasmonat förderlich für die Regeneration von Adventivwurzeln zu sein scheint. In den *Petunia*-Stecklingen akkumulierten sowohl Auxin als auch Jasmonat während der Induktionsphase, wobei beide Phytohormone direkt nach der Stecklingsernte ein Maximum durchliefen. Ferner war für Auxin ein zweiter späterer Anstieg nachzuweisen (siehe auch Abbildung 3-4 bzw. Abbildung 3-7). Sollte dieser zweite Anstieg die Induktion der Wurzelregeneration bedingen, wäre zu diesem Zeitpunkt ein Verhältnis viel Auxin zu wenig Jasmonat gegeben. Dieses günstige Verhältnis würde nicht mehr bestehen, wenn zum Beispiel die endogenen Gehalte der Jasmonate durch eine Applikation erhöht wären. Dieser Mechanismus erscheint möglich, da sich infolge einer Jasmonat-Applikation an den *Petunia*-Stecklingen weniger Adventivwurzeln regenerierten. Ferner würde für diese Vermutung sprechen, dass die durch die Jasmonat-Applikation bedingte inhibierende Wirkung durch eine gleichzeitige Gabe von Auxin ausgeglichen werden konnte. Dabei schien die inhibierende Wirkung der JA weniger dominant zu sein als die stimulierende Wirkung von Auxin, da JA die Auxin-Wirkung bei gleichzeitiger Applikation nicht beeinträchtigte (siehe auch Abbildung 3-12). Ein ähnlicher Befund ist auch für *Panax ginseng* beschrieben. Eine alleinige Applikation von Methyl-JA inhibiert die Entwicklung von Adventivwurzeln. Wird zusätzlich zu Methyl-JA Auxin appliziert, fördert dies die Wurzelentwicklung (Kim *et al.*, 2007). Die hier diskutierte Möglichkeit einer antagonistischen Wechselwirkung von Auxin und Jasmonat wird durch den Sachverhalt gestützt, dass die inhibierende Wirkung der JA stärker ausfiel, nachdem die spezifische Verteilung bzw. die endogenen Gehalte des Auxins durch die Verwendung geeigneter Inhibitoren verändert waren und somit kein Ausgleich der inhibierenden Wirkung möglich war.

Eine ähnliche Wechselwirkung wäre auch für Jasmonate und Ethylen denkbar. So erreichten die ACC-Gehalte 24 Stunden nach der Stecklingsernte ein Maximum. Zu diesem Zeitpunkt fielen die endogenen Gehalte der Jasmonate vergleichsweise niedrig aus (siehe auch Abbildung 3-4 bzw. Abbildung 3-8). Somit wäre zu diesem Zeitpunkt ein Verhältnis viel Ethylen bzw. ACC zu wenig Jasmonat gegeben. Für eine antagonistische Wechselwirkung würde ebenfalls sprechen, dass die durch die Jasmonate bedingte Inhibierung der Wurzelregeneration durch eine zusätzliche Gabe von Ethylen-freisetzenden Substanzen ausgeglichen wurde und die inhibierende Wirkung der Jasmonate stärker ausfiel, wenn die Freisetzung von Ethylen durch das Verwenden geeigneter Inhibitoren verhindert wurde.

Neben der direkten Wirkung über die endogenen Gehalte könnten die Jasmonate auch indirekt auf den Prozess der Adventivwurzelentwicklung einwirken, indem sie die Biosynthese oder die Signalweiterleitung anderer Phytohormone beeinflussen. Solch ein indirekter Einfluss der Jasmonate ist für den Prozess der Lateralwurzelentwicklung beschrieben. So ist mit Hilfe von Applikationsexperimenten gezeigt, dass die Auxin-Biosynthese durch Jasmonate induziert werden kann (Dombrecht *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009). Für die Biosynthese von Auxin wird die Trp-Biosynthese als kritischer Schritt bzw. als Voraussetzung angesehen. Im ersten Schritt dieses

Biosynthesewegs wird die Umsetzung von Chorismat und Glutamin zu Anthranilat durch die Anthranilatsynthase katalysiert. Die Expression der für die α - bzw. β -Untereinheit der Anthranilatsynthase kodierenden Gene *ASA1* (*ANTHRANILATE SYNTHASE α 1*) und *ASB1* (*ANTHRANILATE SYNTHASE β 1*) ist durch Methyl-JA induzierbar (Sasaki *et al.*, 2001; Devoto *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009). Dies hat eine Aktivierung der Trp- und daraus resultierend die Aktivierung der Auxin-Biosynthese zur Folge und führt zur Akkumulation freier IAA in Spross und Wurzel (Sun *et al.*, 2009). Der Mechanismus wurde mit Hilfe von *asa1*-Mutanten bestätigt. In diesen Mutanten wird die durch Jasmonate induzierbare Expression von *ASA1* und folglich auch die Akkumulation von Trp blockiert, sodass weniger Auxin im Basalmeristem der Wurzel nachzuweisen ist (Sun *et al.*, 2009). Dies beeinträchtigt wiederum die Entwicklung von Lateralwurzeln. So nimmt man an, dass Jasmonate die Trp- bzw. Auxin-Biosynthese aktivieren und dadurch die Ausbildung von Lateralwurzeln fördern (Sun *et al.*, 2009).

Aber nicht nur die Auxin-Biosynthese, sondern auch der polare Auxin-Transport (PAT), ist für den Prozess der Lateralwurzelentwicklung relevant. Der PAT reguliert die Rate des interzellulären Auxin-Flusses, was zu einer spezifischen Verteilung des Auxins in der Wurzel führt und somit für Initiation und Entwicklung der Wurzeln essentiell ist. Wird der PAT durch die Verwendung geeigneter Inhibitoren gestört, ändert sich die spezifische Verteilung des Auxins und die Entwicklung der Lateralwurzeln kann gestört werden. Dem PAT ordnet man drei Klassen von Auxin-Transport-Proteinen zu: P-Glykoproteine, *AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1* sowie *PIN-FORMED* (PIN) (Blakeslee *et al.*, 2007; Titapiwatanakun und Murphy, 2009). Letztere können auch durch Methyl-JA transkriptional und translational reguliert sein. So nimmt zum Beispiel nach einer Methyl-JA-Behandlung das Proteinvorkommen von PIN1 und PIN2 ab und die subzelluläre Verteilung von PIN2 ändert sich (Sun *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011). Jasmonate können den für die Lateralwurzelentwicklung wichtigen PAT aber auch über die Flavonoid-Biosynthese beeinträchtigen. So wird die Expression von Genen, die für Enzyme der Flavonoid-Biosynthese kodieren, infolge einer Methyl-JA-Applikation induziert (Gundlach *et al.*, 1992; Alonso *et al.*, 2003). Weiterhin stimulieren Jasmonate die Synthese verschiedener Flavonoide. So akkumuliert zum Beispiel nach einer Behandlung mit Methyl-JA in *Medicago truncatula*-Zellkulturen das Isoflavonoid Medicarpin (Naoumkina *et al.*, 2007), in *Nicotiana tabacum*-Zellkulturen Scopoletin (Sharan *et al.*, 1998) und in *Tulipa gesneriana*-Pflanzen Anthocyanin (Saniewski *et al.*, 1998). Durch die erhöhten Flavonoid-Gehalte wird der PAT in einer ähnlichen Art und Weise beeinträchtigt, wie dies für eine Applikation von Auxin-Transport-Inhibitoren beschrieben ist (Besseau *et al.*, 2007). Da sich trotz des durch die Jasmonate beeinträchtigen PATs Lateralwurzeln entwickeln, scheint die für die Lateralwurzelentwicklung unabdingbare Akkumulation des Auxins im Basalmeristem nicht so stark gestört zu sein wie dies beispielsweise durch spezifische Inhibitoren des Auxin-Transports möglich wäre. Ferner wird der gestörte PAT durch die Jasmonat-induzierte gesteigerte Biosynthese von Trp bzw. Auxin ausgeglichen (Sun *et al.*, 2009).

In Bezug auf das Wachstum von Primärwurzeln scheint die Regulation etwas anders abzulaufen. Auch hier ist der PAT für die spezifische Verteilung des Auxins in der Wurzel von Bedeutung. Das Längenwachstum der Primärwurzeln wird jedoch über die Verteilung des Auxins im Apikalmeristem reguliert. Dieses reagiert auf eine vermehrte Akkumulation von Auxin empfindli-

cher als das Basalmeristem (Stepanova *et al.*, 2005). Würde infolge einer Jasmonat-Applikation vermehrt Auxin synthetisiert und gleichzeitig der polare Transport gestört, kann die spezifische Verteilung des Auxins in der Wurzel nicht mehr sichergestellt werden und die hohen endogenen Auxin-Gehalte im Apikalmeristem inhibieren das Längenwachstum der Primärwurzeln (Stepanova *et al.*, 2005; Dombrecht *et al.*, 2007). Ein ähnlicher Wirkmechanismus erscheint auch für die Regeneration von Adventivwurzeln möglich. So ist nicht auszuschließen, dass auch für diesen Entwicklungsprozess eine spezifische Verteilung von Auxin in der Wurzelregenerationszone essentiell ist. Würde man den PAT infolge einer Jasmonat-Behandlung über die PIN-Transporter oder über ein erhöhtes Flavonoid-Vorkommen stören, wäre eine spezifische Verteilung von Auxin in der Wurzelregenerationszone nicht mehr sichergestellt. Daraus resultierend würden an den zu bewurzelnden Stecklingen weniger oder keine Adventivwurzeln regenerieren.

Aber nicht nur die durch Jasmonate beeinflusste Biosynthese bzw. der polare Transport des Auxins, auch Überschneidungen hinsichtlich der Signalerkennung und –Weiterleitung könnten für die Regulation der Adventivwurzelentwicklung eine Rolle spielen. Der SCF *transport inhibitor response 1* (SCF^{TIR1})-Komplex ist für die Signalerkennung sowie die Signalweiterleitung des Auxins essentiell. Infolge einer vermehrten Auxin-Freisetzung bindet der SCF^{TIR1}-Komplex den *repressor* Aux/IAA und führt diesen dem Ubiquitin-Ligase-vermittelten Abbau durch das 26S Proteasom zu. Dadurch werden die entsprechenden Transkriptionsfaktoren frei und die Expression von Auxin-induzierbaren Genen wird möglich. Der Weg der Signalerkennung bzw. –weiterleitung der Jasmonate ist dem des Auxins sehr ähnlich. Das von der JA abgeleitete AS-Konjugat JA-Ile wird durch den COI1-JAZ-Rezeptorkomplex erkannt (Sheard *et al.*, 2010). COI1 ist wie TIR1 ebenfalls ein F-Box Protein (Xie *et al.*, 1998), welches zusammen mit SKP1, RBX1 und Cullin1 den SCF^{COI1}-Komplex bildet. Zielproteine des SCF^{COI1}-Komplexes wiederum sind die JAZ-Proteine. Eine vermehrte Freisetzung von JA-Ile fördert die Bindung von COI1 und JAZ-Proteinen und somit deren Ubiquitin-vermittelten Abbau. Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel MYC2, werden dadurch frei und die Expression der entsprechenden Gene wird induziert. Die Expression von JAZ1 kann aber nicht nur durch Jasmonate, sondern auch durch Auxin induziert werden (Grunewald *et al.*, 2009). Die Auxin-induzierbare Expression ist dabei von der JA-Signalweiterleitung unabhängig und wird über Aux/IAA reguliert. Da Auxin die Stabilität von JAZ1 nicht beeinträchtigt, gehen die Autoren davon aus, dass Jasmonate und Auxin in Bezug auf die Regulation von JAZ1 unterschiedlich agieren (Grunewald *et al.*, 2009). Wie bereits erwähnt, beeinflusst JAZ1 unter anderem die Aktivität des Transkriptionsfaktors MYC2 und dieser kann als ein positiver Regulator der Lateralwurzelentwicklung agieren (Yadav *et al.*, 2005). Aufgrund dessen, dass JAZ1 ebenfalls an der Entwicklung der Lateralwurzeln beteiligt zu sein scheint, vermutet man, dass JAZ1 sowohl durch Jasmonate als auch durch Auxin genutzt wird, um über MYC2 die Expression entsprechender Gene zu regulieren und dadurch zum Beispiel die Entwicklung von Lateralwurzeln zu beeinflussen (Grunewald *et al.*, 2009). Somit könnten Jasmonate über die Induktion der Auxin-Biosynthese oder über den polaren Auxin-Transport in die Adventivwurzelentwicklung eingreifen. Aber auch Überschneidungen im Hinblick auf die Signalweiterleitung von Jasmonat bzw. Auxin könnten ursächlich sein.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass Jasmonate zusammen mit Ethylen in die Regulation der Adventivwurzelentwicklung eingreifen. So ist bereits für verschiedene pflanzliche Prozesse eine interagierende Wirkung beider Phytohormone beschrieben. Zum Beispiel interagieren Jasmonate und Ethylen im Prozess des durch Ozon induzierten Zelltods (Overmyer *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2000; Tuominen *et al.*, 2004), in der Entwicklung des apikalen Hakens (Ellis und Turner, 2001, 2002; Wang *et al.*, 2002a) sowie in der Reaktion der Pflanze auf Verwundung (Rojo *et al.*, 1999) antagonistisch. Für die Abwehr von nekrotrophen Pathogenen wie *Botrytis cinerea* oder *Plectosphaerella cucumerina* ist eine synergistische Wirkung beider Phytohormone beschrieben (Norman-Setterblad *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002a). So resultiert aus einer Infektion mit den erwähnten Pathogenen eine Akkumulation von endogenem Ethylen sowie Jasmonat, aufgrund dessen der Transkriptionsfaktor ERF1 (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*) aktiviert wird (Lorenzo *et al.*, 2003). Dieser induziert die Expression nachgeschalteter Gene, wie zum Beispiel *PR1b* bzw. *PR5* (*Pathogenesis-related*) sowie *PDF1.1* bzw. *PDF1.2* (*Plant defensin*), deren Genprodukte die Ausbreitung der Infektion verhindern (Xu *et al.*, 1994; Penninckx *et al.*, 1996; Penninckx *et al.*, 1998). Aber auch für die antagonistische Wirkung von Jasmonaten und Ethylen in der Reaktion der Pflanze auf Verwundung spielt der Transkriptionsfaktor ERF1 eine zentrale Rolle (Lorenzo *et al.*, 2004). Bedingt durch einen Verwundungsreiz oder durch die Applikation von Jasmonaten wird die Expression bestimmter Gene wie *VSP2* (*Vegetative storage protein 2*), *LOX3*, und *TAT* (*Tyrosine aminotransferase*) induziert. Dagegen verhindert Ethylen die Expression dieser Gene (Rojo *et al.*, 1999; Shoji *et al.*, 2000; Ellis und Turner, 2001; Lorenzo *et al.*, 2004; Tuominen *et al.*, 2004). Die antagonistische Wirkung von Jasmonat und Ethylen in der Reaktion der Pflanze auf Verwundung ist sicher für den durch die Ernte der *Petunia*-Stecklinge verursachten Verwundungsreiz von Bedeutung. Ob dies jedoch die nachfolgende Regeneration von Adventivwurzeln beeinträchtigt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht gesagt werden. Ebenso ist nicht klar, ob sich die Signalweiterleitung der Jasmonate bzw. des Ethylens unabhängig vom Verwundungsereignis im Hinblick auf die Wurzelentwicklung bedingen.

Schlussendlich ist es sehr wahrscheinlich, dass Wechselwirkungen zwischen Jasmonat und Auxin bzw. Jasmonat und Ethylen für den Prozess der Adventivwurzelentwicklung von Bedeutung sind. Dabei können die in diesem Abschnitt diskutierten Möglichkeiten von Interaktionen gleichzeitig ablaufen oder sie bedingen sich gegenseitig und beeinflussen somit die Regeneration von Adventivwurzeln.

Trotzdem die Behandlung der *Petunia*-Stecklinge mit Jasmonaten erste Hinweise auf eine mögliche Wirkung dieses Phytohormons im Hinblick auf die Regeneration von Adventivwurzeln gibt, ist dieser Ansatz differenziert zu betrachten. Das Applizieren exogener Substanzen wird durch Faktoren wie zum Beispiel die Aufnahme, den Transport und die Metabolisierung der applizierten Substanzen beeinflusst und kann so die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Ebenso ist davon auszugehen, dass die Menge der entsprechenden Substanz meist unphysiologisch ist und für die Pflanze sogar toxisch sein kann. So ist nicht klar zu definieren, ob es sich um eine Regulation des zu untersuchenden Prozesses oder um den Schutz der Pflanze vor der toxischen Dosis handelt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines zweiten Lösungsan-

satzes untersucht, ob eine modulierte Jasmonat-Biosynthese die Ausbildung von Adventivwurzeln in *Petunia*-Stecklingen beeinflusst. Hierfür wurde versucht, die Kapazität der Biosynthese über das Jasmonat-Biosynthese-Enzym AOC zu erhöhen und dadurch die Jasmonat-Gehalte in *Petunia* zu verändern. In den die AOC überexprimierenden Pflanzen, sollten somit vermehrt Jasmonate akkumulieren. Da die Jasmonat-Biosynthese über die Verfügbarkeit des Substrats reguliert wird, war davon auszugehen, dass die Jasmonate erst nach einem Stimulus vermehrt nachzuweisen sein würden (siehe auch Punkt (2)). Trotz der erhöhten AOC-Transkript-Akkumulation waren wider Erwarten keine Änderungen in Bezug auf das Proteinvorkommen sowie auf die in pflanzlichen Proteinrohextrakten enthaltene enzymatische Aktivität der AOC nachzuweisen. Demzufolge konnte auch nicht damit gerechnet werden, dass sich die Kapazität der Jasmonat-Biosynthese und somit die endogenen Jasmonat-Gehalte nach einem Verwundungsreiz erhöhen. Die Frage, warum sich die erhöhte Akkumulation des AOC-Transkripts nicht auf Ebene des Proteins niederschlug, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Eine Regulation zur Begrenzung des AOC-Vorkommens ist eher unwahrscheinlich, da der Ansatz der AOC-Überexpression in *Solanum lycopersicum* bereits erfolgreich zur Anwendung kam und dort ein solcher Regulationsmechanismus nicht beschrieben wurde (Stenzel *et al.*, 2003a; Miersch *et al.*, 2004).

(6) EINE REDUKTION DER ENDOGENEN JASMONAT-GEHALTE VERZÖGERT DEN BEGINN DER WURZELREGENERATION

Wie unter Punkt (5) diskutiert, ist ein durch eine Applikation hervorgerufener Überschuss an Jasmonaten nicht förderlich für die Regeneration von Adventivwurzeln. Dieser Sachverhalt schließt eine mögliche Funktion der Jasmonate im Prozess der Wurzelregeneration jedoch nicht aus. So ist es vorstellbar, dass bestimmte endogene Jasmonat-Gehalte notwendig sind, um die *Petunia*-Stecklinge erfolgreich zu bewurzeln. Auf jeden Fall müssten sich zu niedrige Jasmonat-Gehalte ungünstig auf die infolge der Ernte verursachte Verwundungsreaktion auswirken. Um diesbezüglich Aussagen machen zu können, wurden transgene Pflanzen generiert. In diesen sollte das Genprodukt der *PhAOC* über den Mechanismus der *RNAi* reduziert werden, um somit die endogenen Jasmonat-Gehalte zu minimieren. Die endogenen Gehalte wurden bereits in anderen Pflanzen-Spezies wie *Medicago truncatula* oder *Solanum lycopersicum* sowohl über den Mechanismus der *RNAi* als auch über den der *Antisense*-Expression erfolgreich vermindert (Stenzel *et al.*, 2003a; Isayenkov *et al.*, 2005; Zdyb *et al.*, 2011) und auch im Rahmen dieser Arbeit wurde der *RNAi*-Effekt in *Petunia* erfolgreich angewendet. In den *PhAOC-RNAi*-Pflanzen waren sowohl die Transkript-Akkumulation der *PhAOC* als auch das Proteinvorkommen und die in pflanzlichen Proteinrohextrakten enthaltene enzymatische Aktivität der AOC reduziert. Dies wirkte sich wie erwartet auf die endogenen Jasmonat-Gehalte aus, die in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen ebenfalls niedriger waren als die in denen der Kontroll-Pflanzen. Die reduzierten endogenen Jasmonat-Gehalte der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen hatten wie auch in *Medicago truncatula* (Isayenkov *et al.*, 2005) keine Änderungen im Phänotyp der adulten Pflanzen zur Folge, wirkten sich aber auf die Bewurzelung der von den *PhAOC-RNAi*-Pflanzen stammenden Stecklinge aus.

So regenerierten diese weniger Wurzeln als die Stecklinge der Kontroll-Pflanzen. Auf das Längenwachstum der Adventivwurzeln hatte der *RNAi*-Effekt keinen Einfluss. Aufgrund dieser Befunde lässt sich vermuten, dass die reduzierten Jasmonat-Gehalte nicht die Wurzelregeneration an sich unterbinden, sondern dass die reduzierte Wurzelanzahl eher auf eine Verschiebung des Induktionszeitpunkts zurückzuführen ist. Dies wird auch in Bezug auf die Anzahl der nachgewiesenen Primordien in der Wurzelregenerationszone deutlich. In den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen waren eine Woche nach der Ernte kaum Primordien nachzuweisen. Aber bereits ein Woche später hatte sich die Anzahl der Primordien an die der Kontroll-Pflanzen angeglichen und der *RNAi*-Effekt wurde nur noch anhand der verminderten Anzahl sichtbarer Wurzeln deutlich (siehe auch Abbildung 3-30).

Durch welche Mechanismen die Verzögerung ausgelöst wird, ist nicht bekannt, eine Wechselwirkung zwischen Jasmonat und Auxin bzw. Ethylen ist jedoch nicht wahrscheinlich. Eine Jasmonat-Applikation kann eine vermehrte Synthese von Auxin (siehe auch Punkt (5)) bzw. Ethylen zur Folge haben (Saniewski und Czapski, 1990; Saniewski *et al.*, 1998; Skrzypek *et al.*, 2005). Somit wäre es vorstellbar, dass der durch die Stecklingsernte verursachte transiente Anstieg der Jasmonate die Biosynthese beider Phytohormone induziert. Da die Jasmonate in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen kaum akkumulierten, müssten dementsprechend auch die Gehalte von Auxin bzw. Ethylen beeinflusst sein. Dies traf jedoch nicht zu. In den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen akkumulierten freie IAA sowie ACC in ähnlicher Art und Weise wie in denen der Kontroll-Pflanzen. Demzufolge ist von einer Wechselwirkung zwischen Jasmonat und Auxin sowie zwischen Jasmonat und Ethylen nur auszugehen, wenn die endogenen Gehalte in den Stecklingen durch eine Jasmonat-Applikation erhöht vorliegen (siehe auch Punkt(5)).

Für eine verzögerte Induktion der Wurzelentwicklung könnte eine veränderte Kohlenhydrat-Verteilung im Steckling ursächlich sein. Kohlenhydrate sind als Baustoff und als Energiequelle für eine Vielzahl von Entwicklungs- und Wachstumsprozessen von Bedeutung, spielen aber auch als Signalmoleküle eine Rolle. So reguliert Saccharose die Verteilung der Kohlenhydrate in der Pflanze (Roitsch, 1999; Smeekens, 2000), kann aber auch die Expression einer Vielzahl von Genen beeinflussen (Koch, 1996; Smeekens, 1998). Die Verteilung der Kohlenhydrate variiert in den verschiedenen pflanzlichen Geweben und beeinflusst dadurch das Wachstum und die Entwicklung. In höheren Pflanzen findet die CO₂-Fixierung vornehmlich in Mesophyll-Zellen des vollentwickelten Blattes statt (*source*-Gewebe). Wiederum heterotrophe Zellen von Wurzeln oder reproduktive Strukturen und Speicher haben einen erhöhten Bedarf an Kohlenhydraten und sind somit auf eine Versorgung mit selbigen angewiesen (*sink*-Gewebe). Die Haupttransportform der Kohlenhydrate ist die Saccharose. Saccharose wird im *source*-Gewebe aktiv in das Phloem transportiert und im *sink*-Gewebe erfolgt dessen passive Entladung. Dabei nehmen die Zellen des *sink*-Gewebes die Saccharose entweder direkt über einen Saccharose-Transporter auf oder die Saccharose wird durch Zellwand-gebundene Invertasen in Glukose und Fruktose hydrolysiert und über einen Monosaccharid-Transporter in die Zelle eingebracht (Truernit *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2000). Dadurch wird die *sink*-Stärke in den entsprechenden Geweben aufrechterhalten. Dieses Aufrechterhalten der *sink*-Stärke und das daraus resultierende Sicherstellen der Kohlenhydrat-Versorgung sind für das Wachstum von Primär- und Lateralwurzeln essentiell

(Bingham *et al.*, 1997; Nagel *et al.*, 2006). Aber auch für die Regeneration von Adventivwurzeln muss eine ausreichende Versorgung mit Kohlenhydraten gewährleistet sein. Nach dem vollständigen Abtrennen des Stecklings von der Mutterpflanze ist es zunächst nötig, den *sink*-Status in der Wurzelregenerationszone der Stecklinge zu etablieren und diesen nachfolgend zu erhalten. Dies beeinflusst wiederum die Biosynthese und den Transport der Kohlenhydrate, sodass die endogenen Gehalte während der Adventivwurzelentwicklung in der Stecklingsbasis ansteigen (Altman und Wareing, 1975; Okoro und Grace, 1976; Hansen *et al.*, 1978; Veierskov *et al.*, 1982; Ahkami *et al.*, 2009). Werden die photosynthetisch aktiven Organe des Stecklings entfernt, beeinträchtigt dies die Versorgung des *sink*-Gewebes mit Kohlenhydraten und es regenerieren keine Adventivwurzeln. Dies kann nur durch eine zusätzliche Gabe von Kohlenhydraten teilweise oder vollständig ausgeglichen werden (Overbeek *et al.*, 1946; Nanda *et al.*, 1971; Veierskov *et al.*, 1976; Fabijan *et al.*, 1981). Ähnlich verhält es sich, wenn Stecklinge im Dunkeln bewurzelt werden. So bilden sich nur nach einer zusätzlichen Kohlenhydrat-Applikation Adventivwurzeln aus (Nanda und Jain, 1971; Lovell *et al.*, 1972; Lovell *et al.*, 1973; Eliasson, 1978; Bhattacharya und Kumar, 1980; Takahashi *et al.*, 2003). Andererseits inhibiert ein Zuviel an Kohlenhydraten die Wurzelregeneration. Ist die photosynthetische Aktivität der Stecklinge ausreichend, wirkt sich eine Applikation von Kohlenhydraten inhibierend auf die Adventivwurzelentwicklung aus oder es ist keine Wirkung nachzuweisen (Bachelard und Stowe, 1962; Nanda *et al.*, 1971; Lovell *et al.*, 1972; Lovell *et al.*, 1973; Takahashi *et al.*, 2003).

Die Verteilung der Kohlenhydrate in den Stecklingen kann aber nicht nur über die Kohlenhydrate an sich sondern auch über die Wirkung von Phytohormonen beeinflusst sein. So steigen die endogenen Gehalte von löslichen Zuckern in der Wurzelregenerationszone von Stecklingen infolge einer Auxin-Behandlung an (Overbeek *et al.*, 1946; Altman und Wareing, 1975; Brunner, 1977; Robbins *et al.*, 1983). Diese erhöhte Verfügbarkeit im *sink*-Gewebe führt man auf einen durch Auxin-bedingten vermehrten basipetalen Transport der Kohlenhydrate zurück (Mullins, 1970b; Patrick und Wareing, 1973; Altman und Wareing, 1975). Und auch Jasmonate können über die Kohlenhydratverfügbarkeit regulierend eingreifen, wobei dies wahrscheinlich über eine für die Entladung des Phloems wichtige Invertase erfolgt. Invertasen werden je nach Lokalisierung in der Zelle in vakuoläre, zytoplasmatische sowie in Zellwand-gebundene Invertasen unterteilt (Godt und Roitsch, 1997). Zur letzten Gruppe zählt man auch LIN6 (*Lycopersicon Invertase*). Dies ist eine extrazelluläre Invertase aus *Solanum lycopersicum*, die einer kleinen Genfamilie angehört und wichtige Funktionen in der apoplastischen Spaltung der Saccharose und somit in der Aufrechterhaltung des *sink*-Metabolismus einnimmt (Proels und Roitsch, 2009). Die Expression von LIN6 kann durch die Applikation von Jasmonaten induziert werden (Thoma *et al.*, 2003; Proels und Roitsch, 2009) und auch das Transkript eines Gens, welches für die Zellwand-gebundene Invertase Pcl1 aus *Pisum sativum* kodiert, akkumuliert infolge einer Jasmonat-Behandlung (Zhang *et al.*, 1996). Aufgrund dieses Sachverhaltes vermutet man, dass Jasmonate über Zellwand-gebundene Invertasen den *sink*-Status des entsprechenden Gewebes etablieren oder aufrechterhalten und somit auch die Biosynthese und den Transport von Kohlenhydraten beeinflussen können (Hause *et al.*, 2007; Ahkami *et al.*, 2009). Da in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi* Pflanzen weniger Jasmonate akkumulierten als in denen der Kontroll-Pflanzen, ist es möglich, dass die Expression der für die entsprechenden Invertasen kodierenden Gene in *Petunia* verän-

dert ist und somit die Aktivität der Invertasen nicht ausreicht, um die hydrolytische Spaltung in einem entsprechenden Umfang zu gewährleisten. Dies könnte wiederum eine verminderte Synthese und einen langsameren Transport der Saccharose zur Folge haben und für die verzögerte Induktion der Adventivwurzelentwicklung ursächlich sein.

Der verzögerte Induktionszeitpunkt kann aber auch damit begründet werden, dass die Abwehr der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen beeinträchtigt ist. Die Reaktion der Pflanze auf Verwundung hat die Heilung des geschädigten Gewebes sowie den Schutz der Pflanze zum Ziel. Da diesbezügliche Mechanismen energieaufwändig sind, werden zum Beispiel Entwicklungsprozesse aufgeschoben, um das Überleben der Pflanze zu sichern. Wären in den *PhAOC-RNAi*-Pflanzen tatsächlich die Wundheilung und die Abwehr beeinträchtigt, könnte dies ein Grund für die verzögerte Induktion und somit für die dadurch verzögerte Regeneration von Adventivwurzeln sein.

Schlussendlich konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stecklinge der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen aufgrund reduzierter Jasmonat-Gehalte weniger Adventivwurzeln ausbilden. Dies könnte sich auf eine verzögerte Induktion der Wurzelentwicklung zurückführen lassen. Um herauszufinden, welcher der in diesem Abschnitt diskutierten Mechanismen die verzögerte Wurzelentwicklung verursacht, sollten die *PhAOC-RNAi*-Pflanzen in weiterführenden Experimenten im Hinblick auf eine veränderte Abwehr sowie auf eine veränderte Kohlenhydrat-Verteilung in den Stecklingen untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Im Garten- und Zierpflanzenbau wird eine Vielzahl von Pflanzen nicht generativ über Samen, sondern vegetativ vermehrt. Dabei nutzt man die Regenerationsfähigkeit der Pflanze aus und erzeugt, zum Beispiel über die Bewurzelung von Stecklingen, größere Mengen einheitlich gewachsenen Pflanzenmaterials. Für die Vermehrung über Stecklinge werden Seitentriebe von den Mutterpflanzen abgetrennt und in entsprechendem Medium bewurzelt. Der durch die Stecklingsernte hervorgerufene Verwundungsreiz löst verschiedene Mechanismen in der Pflanze aus, die dem Schutz der selbigen und der Heilung des geschädigten Gewebes dienen.

Der Jasmonsäure und den von ihr abgeleiteten Verbindungen (Jasmonate) kommt in der pflanzlichen Reaktion auf Verwundung eine zentrale Rolle zu. So akkumulieren diese nach einer durch mechanische Einflüsse oder Herbivoren verursachten Schädigung der Pflanze sowohl im verwundeten als auch im unverwundeten Gewebe transient und sind in der Lage, ein breites Spektrum an Abwehrmechanismen zu induzieren. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass für das Modellsystem *Petunia hybrida* vermehrt Jasmonate direkt nach der Stecklingsernte synthetisiert werden. Daraus resultierend akkumulierte auch das Transkript des für das Schlüsselenzym der Jasmonat-Biosynthese, die Allenoxid-Cyclase (AOC), kodierenden Gens. Die den Jasmonaten zeitlich nachgelagerte Akkumulation des *PhAOC*-Transkripts hatte jedoch keinen Einfluss auf das Proteinvorkommen und die enzymatische Aktivität der PhAOC. Während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen änderte sich nur die lokale Verteilung des Proteins. Ein spezifischer Nachweis der PhAOC war über den gesamten Zeitraum der Bewurzelung im Leitgewebe und nach Ausbildung der Adventivwurzeln zusätzlich in den Spitzen neu gebildeter Wurzeln möglich.

Aber nicht nur Jasmonate sondern auch die Phytohormone Auxin und Ethylen akkumulierten in den *Petunia*-Stecklingen direkt nach der Ernte. Der Einfluss von Auxin bzw. Ethylen im Prozess der Adventivwurzelentwicklung ist hinreichend beschrieben. Dagegen stehen kaum Daten in Bezug auf eine Jasmonat-Wirkung zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe von pharmakologischen Experimenten erste Hinweise auf eine Jasmonat-Wirkung aufgezeigt werden. So beeinträchtigte eine Behandlung von *Petunia*-Stecklingen mit Jasmonaten deren Bewurzelung, sodass an den entsprechenden Stecklingen weniger Adventivwurzeln regenerierten. Auch die durchschnittliche Länge der neugebildeten Wurzeln wurde infolge einer Jasmonat-Behandlung reduziert. Die inhibierende Wirkung der Jasmonsäure in Bezug auf die Anzahl der neu gebildeten Adventivwurzeln wurde durch eine zusätzliche Applikation von Auxin oder Ethylen-freisetzenden Substanzen abgeschwächt und infolge von reduzierten Auxin- und Ethylen-Gehalten verstärkt. Dies könnte für eine antagonistische Wechselwirkung zwischen Jasmonat und Auxin bzw. Jasmonat und Ethylen sprechen.

Die Interpretation der mit Hilfe der pharmakologischen Experimente erhaltenen Ergebnisse wurde jedoch dadurch erschwert, dass diese nur bedingt den physiologischen Zustand der Pflanze widerspiegeln können. Deshalb wurden in einem weiteren experimentellen Ansatz transgene *Petunia*-Pflanzen generiert, in denen die endogenen Gehalte der Jasmonate über das Vorkommen der AOC moduliert wurden. Durch den Effekt der *RNAi* akkumulierte in den transgenen Pflanzen

weniger *PhAOC*-Transkript und daraus resultierend waren auch das Proteinvorkommen und die enzymatische Aktivität der PhAOC reduziert. Aufgrund dieser Ergebnisse war von einer geringeren Kapazität der Jasmonat-Biosynthese auszugehen. Da in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen nach dem durch die Ernte hervorgerufenen Verwundungsreiz deutlich weniger Jasmonate akkumulierten, konnte diese Annahme bestätigt werden.

Die *PhAOC-RNAi*-Pflanzen zeigten keine auffälligen phänotypischen Veränderungen, allerdings regenerierten die Stecklinge dieser Pflanzen weniger Adventivwurzeln. Dies könnte sich auf eine verzögerte Initiation der Wurzelentwicklung zurückführen lassen, wobei für die Verzögerung die verringerten Jasmonat-Gehalte ursächlich zu sein scheinen. Eine Wechselwirkung von Jasmonat und Auxin bzw. Jasmonat und Ethylen ist diesbezüglich nicht wahrscheinlich, da keine Änderungen der Gehalte von freier IAA (Indol-3-essigsäure) bzw. von ACC (1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure; direkte Biosynthese-Vorstufe des Ethylens) in den Stecklingen der *PhAOC-RNAi*-Pflanzen nachzuweisen waren.

Die Mechanismen der Jasmonat-Wirkung im Prozess der Adventivwurzelentwicklung konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden, aber mit Hilfe der dargestellten Ergebnisse wurde gezeigt, dass sowohl zu hohe als auch zu niedrige Jasmonat-Gehalte die Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen beeinträchtigen. Dabei kann die inhibierende Wirkung von einem Zuviel an Jasmonat durch Auxin bzw. Ethylen in einem bestimmten Rahmen ausgeglichen und somit abgeschwächt werden.

6 Anhang

6.1 Oligonukleotide

Tabelle 6-1: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Isolierung und Klonierung der *PhAOC* mittels 5' RACE-PCR Verwendung fanden. for: *forward*, rev: *reverse*, T_m: Schmelztemperatur.

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5'-3')	T _m [°C]
5'-RACE CDS	(T)25V N (N = A, C, G, oder T; V = A, G, oder C)	
BD SMART II A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	70,8
Oligo (dT) ₁₉	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	35,0
degeneriertes Oligonukleotid	TTYTAYTTYGGSGAYTAYGG (Y = C oder T; S = C oder G)	54,2
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	58,4
GSP1	AATGCCGGATCCACCAGTGAC	61,8
GSP2	TGCCGGATCCACCAGTGACTGCAAGATATG	69,5

Tabelle 6-2: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Erzeugung des Expressionsvektors pET28(+) verwendet wurden. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI* sind durch Unterstreichung hervorgehoben. for: *forward*, rev: *reverse*, T_m: Schmelztemperatur.

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5'-3')	T _m [°C]
AOEx <i>NcoI</i> -for	GAT <u>CCATGG</u> CAACATCCACTAACTCCAAGTCATT	68,3
AOEx <i>XhoI</i> -rev	GAT <u>CTCGAG</u> ATTAGTAAAATTTTTCACTGTAGCCCCAGCTTC	70,4
AOEx <i>XhoI</i> STOP-rev	GAT <u>CTCGAG</u> CTAATTAGTAAAATTTTTCACTGTAGCCCC	71,3

Tabelle 6-3: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Erzeugung der 35S::*AOC-sense*- und 35S::*AOC-RNAi*-Konstrukte verwendet wurden. Die CACC-Überhänge für die gerichtete Klonierung in den *pENTR/SD/D-TOPO* Vektor sind durch Unterstreichung hervorgehoben. for: *forward*, rev: *reverse*, T_m: Schmelztemperatur.

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5'-3')	T _m [°C]
PhAOC859-rev	CCTCCTAATTAGTAAAATTTTTCACTGTAGCCCCAGCTTC	69,5
PhAOC1-for	<u>CACCATGG</u> GCTATTGCTTCTTCAGCCTCTGCAGCTCTT	69,5
MtAOC-rev	TCAGTTGGTGAAGTTTGGTAAAGAGGCATGAG	66,9
MtAOC-for	<u>CACCATGG</u> CATCCATGAGTTCTTTGAAAATGATTTCTTCC	69,5
AOCRNAi-rev	TGGCAGATCAGGAATACCCCTCAAGTAGAAAGTG	68,3
AOCRNAi-for	<u>CACCGG</u> ATTACGGTCACATCGCTGTACAAG	69,5

Tabelle 6-4: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Selektion der transgenen Pflanzen mittels PCR Verwendung fanden. for: *forward*, rev: *reverse*, T_m: Schmelztemperatur.

Ausgangsvektor	Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5`-3`)	T _m [°C]
35S:: <i>AOC-RNAi</i>	Intron-rev	CGAACCCAATTTCCCAACTG	57,3
	Intron-for	TGTTAGAAATTCCAATCTGCTTGTA	56,4
35S:: <i>PhAOC-sense</i>	PhAOC-for	CGAAGATAAGCAGGGCTACC	59,4
	PhAOC-rev	TATCCTTCGCAAGACCCTTC	57,3
35S:: <i>MtAOC1-sense</i>	MtAOC-rev	TATCCTTCGCAAGACCCTTC	57,3
	MtAOC-for	TGCAGGACTTCCTCTATCAC	57,3
LVpMDC	HPT2-rev	TACTCGCCGATAGTGGAAC	57,3
	HPT2-for	AAAGTCTGCCGCTTACAAC	57,3
LVpHell	pHell-rev	GGCGCTCTATCATAGATGTC	57,3
	pHell-for	TATCCTTCGCAAGACCCTTC	57,3

Tabelle 6-5: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Amplifizierung von für die Herstellung von DNA-Sonden benötigten DNA-Fragmenten mittels PCR verwendet wurden. for: *forward*, rev: *reverse*, T_m: Schmelztemperatur.

Spezifischer Nachweis von	Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5`-3`)	T _m [°C]
<i>PhAOC</i>	screenAOC-rev	TCGTGGTAGCCCTGCTTATC	57,3
	screenAOC-for	ACGAAGATAAGCAGGGCTAC	59,4
	AOCsense-for	ATGGCTATTGCTTCTTCAGCCTCTG	63,0
	AOCsense-rev	TCAGGTGATGGCTCCACCGTAG	64,0
35S:: <i>AOC-RNAi</i>	Intron-for	GTCTCGAGGAATTCGGTACC	59,4
	Intron-rev	CGAACCCAATTTCCCAACTG	57,3
LVpHell	KAN-for	TGGGTGGAGAGGCTATTC	56,0
	KAN-rev	TCTTCGTCCAGATCATCC	53,7
35S:: <i>PhAOC-sense</i>	2-HYG-for	ATTTGTGTACGCCCGACAGTCCC	61,4
35S:: <i>MtAOC-sense</i>	2-HYG-rev	CAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATC	59,4
LVpMDC			

Tabelle 6-6: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Auswahl eines möglichen konstitutiv exprimierten Kontroll-Gens für die qRT-PCR Analyse genutzt wurden. for: *forward*, rev: *reverse*, T_m: Schmelztemperatur.

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5´-3´)	T _m [°C]
EF-1α-for	CCTGGTCAAATTGGAAACGG	57,3
EF-1α-rev	CAGATCGCCTGTCAATCTTGG	59,8
Ubiquitin-for	TGGAGGATGGAAGGACTTTGG	59,8
Ubiquitin-rev	CAGGACGACAACAAGCAACAG	59,8
Actin-rev	TCAGCCGAAGTGGTCAAAGAG	59,8
Actin-for	TGCACTCCCACATGCTATCCT	59,8
<i>RPS13</i> -rev	AACAGATTGCCGGAAGCCA	56,7
<i>RPS13</i> -for	AAGCTCCCACCTGTCTGGAAA	59,8
Cyclophilin-rev	TCATCTGCGAACTTAGCACCG	59,8
Cyclophilin-for	AGGCTCATCATTCCACCGTGT	59,8
Tubulin-for	TGGAAACTCAACCTCCATCCA	57,9
Tubulin-rev	TTTCGTCCATTCTTCACCTG	57,9

Tabelle 6-7: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Analyse der Transkript-Akkumulation mittels qRT-PCR Analyse Verwendung fanden. for: *forward*, rev: *reverse*, T_m: Schmelztemperatur.

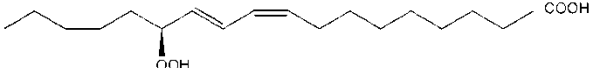
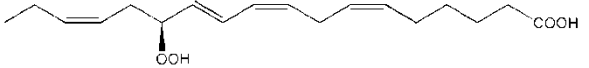
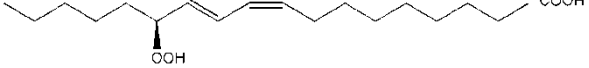
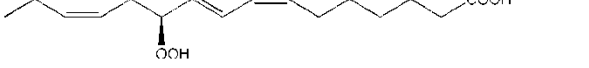
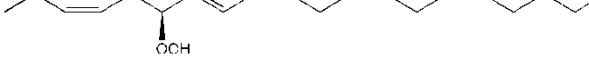

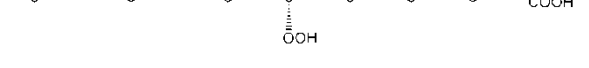
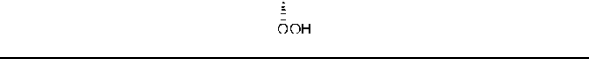
Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5´-3´)	T _m [°C]
PhAOC-rev	CCAGCAACTCAGATGGCAGAT	59,8
PhAOC-for	CGGCATTTTTGCAGGAGTTT	55,3
1MtAOC-for	TTCCGGTCTCTCTGTCTCCTTC	62,1
1MtAOC-rev	GAGTGCATTGGTTCTGGTGTTT	60,3
ACCOx1-for	TACGTGCCACACAGATGC	58,8
ACCOx1-rev	GGGAGGAACATCGATCCATTG	59,8
DevA-20-C01-rev	CATGTCCTCGATGAACTGAAGG	60,3
DevA-20-C01-for	CCTATATCCATAATGGCCGTTGA	61,3

PhAOC	1	MAASS	AS-AA	LRTIS	SS-SFK	L	ASSFPPT	OKI	OSF-KLPM	PL	I	SKTLKLS	T	S-TN
PhAOC	1	MATYS	AS-AA	LRTIS	SS-SFK	L	SSAF-OT	KKI	OSF-KLPM	PL	I	SKHKL	T	TSITTA
StAOC	1	MATYS	AS-AA	LRTIS	SS-SFK	L	PSAFQITLSOKRI	OSL-KLPM	PL	I	SOTKLT	T	TSITTA	
PhAOC	1	MATAS	AS-AA	LRTIS	SS-A-K	AS-AA	TS3FPPTASOKRI	RSF-KLPM	PL	I	SOSIKLG	T	S-TM	
PhAOC1	1	MASSTI	SL-OS	ISMTLANNLSTYK	QRH	R	SSILGRS	RSF	ONF-GISS	NC	P	CS3SPT3	F	T-PK
PhAOC2	1	MSSAV	SL-OS	ISMTI	LN-NLS	C	NOQFHS	SLL	OS3-RSF	Q-NLGISSW3DP	F	SFSFT	A	K-KN
PhAOC3	1	MA-SSS	AA-MS	LESIS	MT-TLANNLRHHR	SSILGRS	RSF	ONL-GISSW3DP	Q	N	KNLW	T	S-KNLW	
PhAOC4	1	MIMASS	AA-ASISMTI	BMNS	RM-HOS	H	Q3FELGF	SRSRHMRI	SSMS	PG	L	STRBST	T	S-ST
PhAOC	1	MMSNS	LKNTS	KLUSH	ST-S	TSPLQO	ROL	VSS-SLSH	SF	L	TKRNTS	T	TROF3-S	
PhAOC1	1	MMSNLSLKNISLNT	SP	LOTON	QIVSSG	L	SLFESR	NMF	NIS-TTKO	V	STTRSS	Q	N-TR	
PhAOC2	1	MAAAP	SS-YA	LRTI	PTFAAT	PR	SF-LTPS	SA	V	AAARSA	G	V-SG		
PhAOC	1	MAVPS	S-VS	VRAGA	SV-SAK	TP	URA	ARA-GLG	RV	S	VSSGRG	G	G-PV	
PhAOC	1	MAVPS	MA-AA	LSPFA	SA-KYS	S	PAASRV	ROJ	SRV-ANCG	FR	Q	HPSRNVG	P	V-AV
PhAOC	1	MASACP	AI-A	LRTIS	SS-SFK	L	LHNTSPSS3LPPP	R3S	LSFTKALS	PS	L	VSTPKLO	I	T-SN
PhAOC	53	SR	FCKSQSSSTD	S-TN	T	KVOELSVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-TM	SLGDLVPSNK	---	LYTGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG	
PhAOC	54	SR	FCKSQSSSTD	S-TN	T	KVOELSVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-TM	SLGDLVPSNK	---	LYTGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG	
PhAOC	58	SR	FCKSQSSSTD	S-TN	T	KVOELSVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-TM	SLGDLVPSNK	---	LYTGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG	
PhAOC	55	SR	FCKSQSSSTD	S-ST	T	KVOELSVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-TM	SLGDLVPSNK	---	LYTGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG	
PhAOC1	59	KR	L	TPRALSONLG	N-TEMPRS	KVOELSVYEMERDRGS	KIKRMA	PS-PRF	GLGDLVPTNK	---	LYTGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG	
PhAOC2	61	LT	A	SPALSONGNI	N-PRP	S	KVOELSVYEMERDRGS	KIKRMA	PS-LMF	GLGDLVPTNK	---	LYTGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG
PhAOC3	66	TR	A	FRNMKXKTN	S-RP	S	KVOELSVYEMERDRGS	AVIKLG	KKPEL	CLGDLVPTNK	---	LYTGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG
PhAOC4	61	GO	F	FRICSSSNDYS	RP	T	KVOELSVYEMERDRGS	AVIKLG	KKPEL	CLGDLVPTNK	---	LYTGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG
PhAOC	56	SR	NITTAFFPNQKHOC	S-SK	PGVOC	LVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-SM	SLGDLVPSNK	---	LYSGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG	
PhAOC1	60	NR	A	LPPNOKHOC	S-SK	A	KVOELSVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-SM	SLGDLVPSNK	---	LYSGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG
PhAOC2	43	RA	RSRVRAS	LSPKPAIKD	A-RP	A	KVOELSVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-SM	SLGDLVPSNK	---	LYSGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG
PhAOC	47	RA	S	LSPKPAIKD	A-RP	A	KVOELSVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-SM	SLGDLVPSNK	---	LYSGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG
PhAOC	47	RA	S	LSPKPAIKD	A-RP	T	KVOELSVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-SM	SLGDLVPSNK	---	LYSGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG
PhAOC	60	PS	SKTL	FCRSQASPSF	SETP	T	KVOELSVYEMERDRGS	AYLRLS	OK-SM	SLGDLVPSNK	---	LYTGLKRRIGITAGLCIL	IKHEEKKGDRVEAL	VSFYFG
PhAOC	151	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC	152	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC	156	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC	153	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC1	161	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC2	160	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC3	165	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC4	161	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC1	160	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC2	157	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC3	148	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC4	146	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC1	157	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN
PhAOC2	162	DYGH	AVOGSPLTY	EDTYLAVTGGSGIF	AVSGOVKL	QI	IPPKLFTYTT	YLRGIP	DIP	SELLGNAV	APSP	TEHSP	EPKAK	CEKATVKNFTN

Abbildung 6-2: Vergleichende Analyse der PhAOC AS-Sequenz mit den Sequenzen anderer bekannter AOCs. Homologe Bereiche sind grau und die für die Aktivität der AtAOC2 wichtigen, konservierten AS sind blau unterlegt.

6.3 Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

Tabelle 6-9: Analyse verschiedener dem 13(S)-HPOT ähnlicher Substanzen in Bezug auf einen möglichen Umsatz durch das rekombinante His-Fusionsprotein. Der gekoppelte Enzym-Aktivitätstest erfolgte wie unter 2.9.7 beschrieben. Pro Ansatz wurde 1 µg gereinigtes rekombinantes Protein eingesetzt.

Bezeichnung	Strukturformel	Umsatz durch das rekombinante Protein
13(S)-HPOT		+
13(S)-HPOTE		+
13(S)-HPOD ⁹		-
11(S)-HPHT		+
15(S)-HPEP		+
15(S)-HPETE ¹⁰		-
9(S)-HPOT ¹¹		-
9(S)-HPOD ¹²		-

⁹ 13(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadiensäure

¹⁰ 15(S)-Hydroperoxy-5(Z),8(Z),11(Z),13(E)-eicosatetraensäure

¹¹ 9(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure

¹² 9(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadiensäure

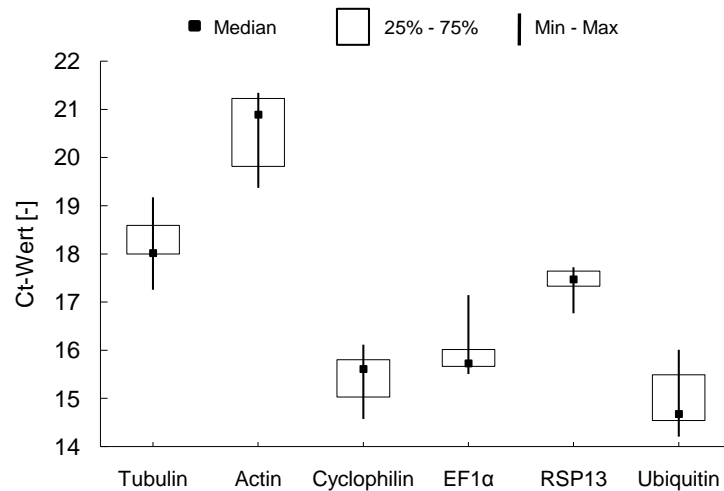


Abbildung 6-3: Die qRT-PCR Analyse (siehe 2.5.2.8) möglicher Referenz-Gene in Bezug auf eine gleichbleibende Expression während der Stecklingsbewurzelung. Als Ausgangsmaterial fand von je drei Stecklingen vereinigt Stängelmaterial Verwendung. Im Diagramm sind die Daten der einzelnen Messpunkte (siehe Punkt 3.1.2) pro Referenz-Gen als Median mit Interquartilabständen (25%-75%) und Varianzbreiten dargestellt.

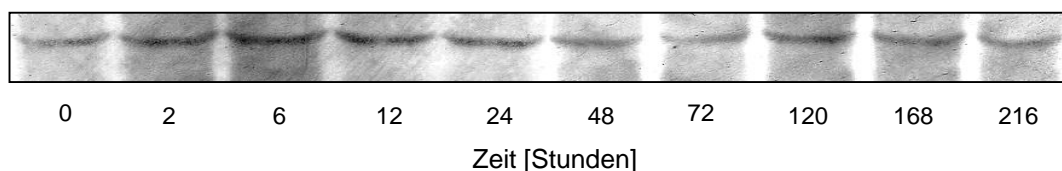


Abbildung 6-4: Die Analyse des Proteinvorkommens der PhAOC (Western Blot-Analyse mit anti-SIAOC Antikörper, siehe 2.9.6) während der Bewurzelung von *Petunia*-Stecklingen. Für die Analyse der enzymatischen Aktivität (siehe 3.1.2.2, Abbildung 3-5 B) und für die Western Blot-Analyse fanden die gleichen Proteinrohextrakte aus *Petunia* Verwendung, wobei für die Western Blot-Analyse 10 µg Protein eingesetzt wurden. Die Western Blot-Analysen von drei unabhängigen Experimenten zeigten gleiche Ergebnisse.

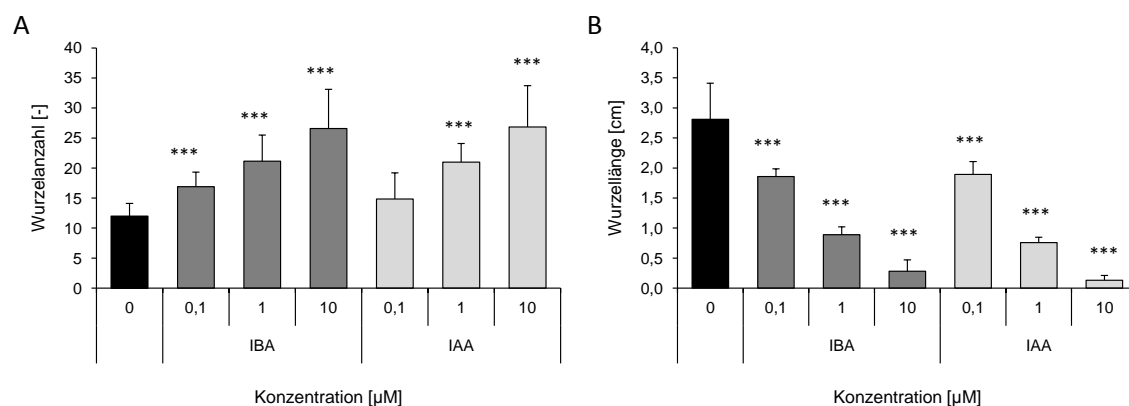


Abbildung 6-5: Die konzentrationsabhängige Wirkung von IBA bzw. IAA auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (n=10) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (***) p<0,001).

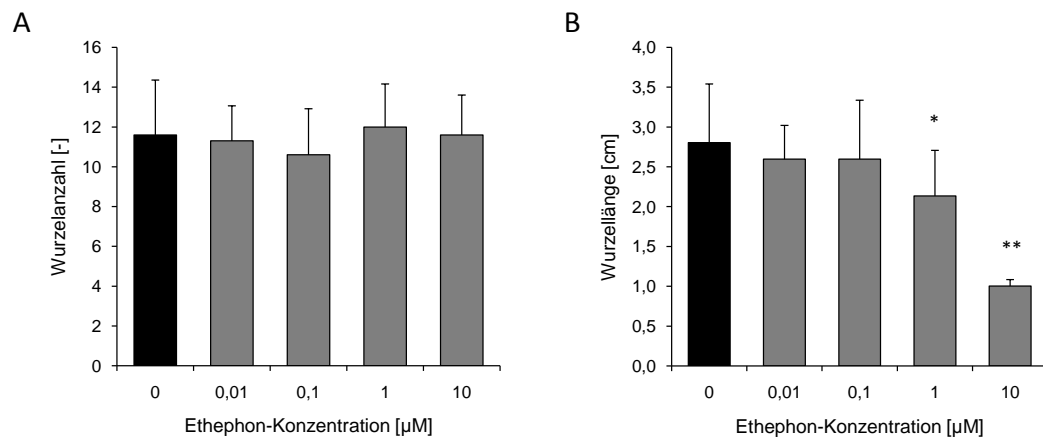


Abbildung 6-6: Die konzentrationsabhängige Wirkung von Ethephon auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte ($n=10$) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

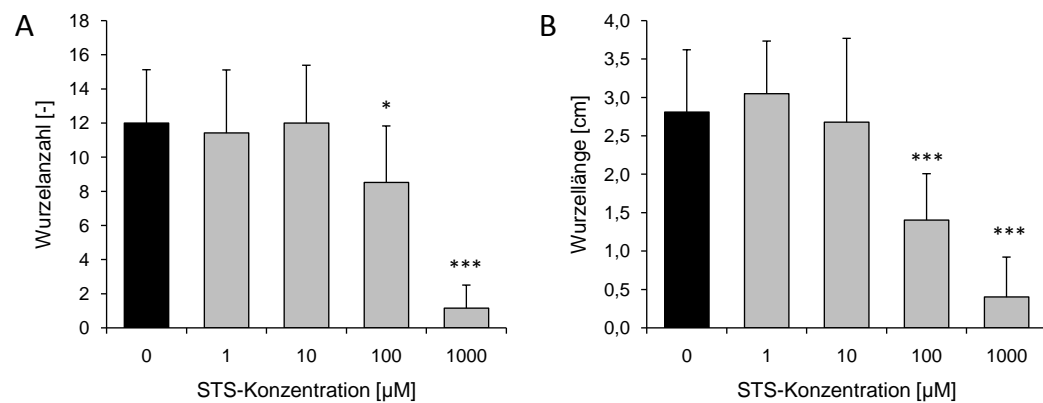


Abbildung 6-7: Die konzentrationsabhängige Wirkung von STS auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte ($n=10$) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

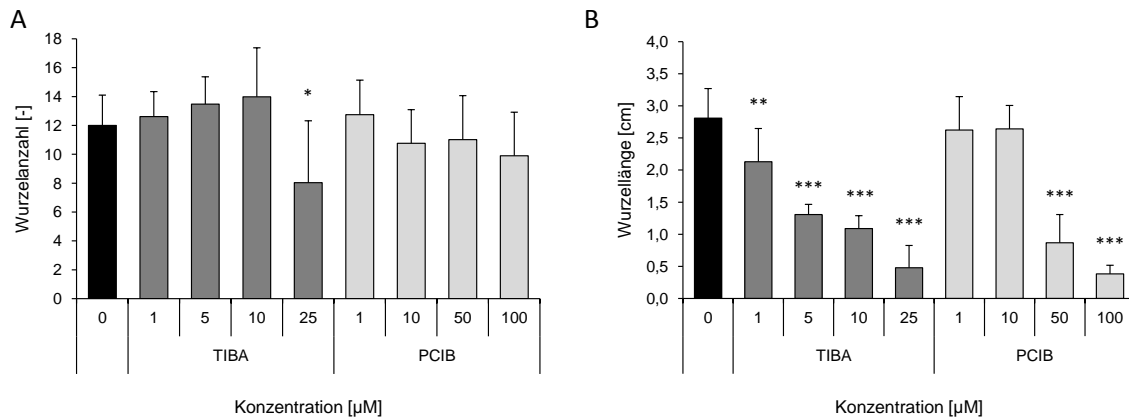


Abbildung 6-8: Die konzentrationsabhängige Wirkung von TIBA bzw. PCIB auf **A** die Wurzelanzahl und **B** die durchschnittliche Wurzellänge. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wovon eines exemplarisch dargestellt ist. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (n=10) und Standardabweichungen. Auf Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student geprüft. Alle mit * gekennzeichneten Balken wiesen im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikante Unterschiede auf (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

```

1  CAGGGGCGGA GC CAAGAATT TTAATAAGGG GGTCAAGAG GACAACCGTT CAAATATAAA AGAGGAAAAA TCAAAAATAT
81 TTGTGGCAGC CCAAGATTCGA TCCTGGGTGG TGAGCCCAGC ATTGACACCC CTCGCCATT GAACATAATGC CAACACTTGT
161 TCAAAGGGGG TTCAACACAC AGTATATATC CAATCTAAAC CAATTTTATC ACATATATGC AGTGATAAAT TTGCGCAAAG
241 GGGGTTC AAT TGACACCCCT TTGCACCAAG TAGCTCCGCC CCTG

```

Abbildung 6-9: Die vollständige Nukleotid-Sequenz des transposablen Elements *dTph1*. Die invers sich wiederholende Nukleotid-Sequenz an den terminalen Enden des transposablen Elements ist rot unterlegt.

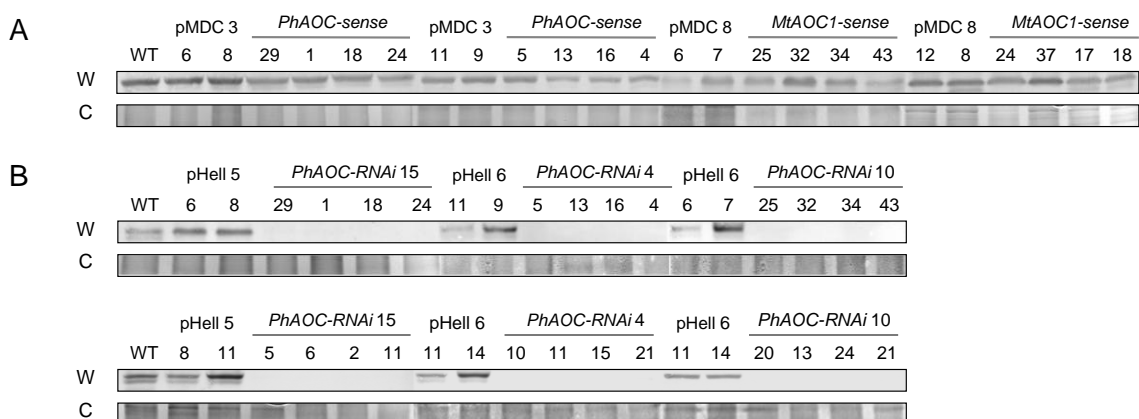


Abbildung 6-10: Der spezifische Nachweis der PhAOC mittels Western Blot-Analyse in den **(A)** pMDC-, *PhAOC-sense*- und *MtAOC1-sense*-Pflanzen sowie in den **(B)** pHell- und *PhAOC-RNAi*-Pflanzen der Generation T1 (anti-SIAOC Antikörper, siehe auch 2.9.6). Für die Analyse der enzymatischen Aktivität (siehe 3.3.2.4, Abbildung 3-23 B und 3.3.2.5, Abbildung 3-25 B) und für die Western Blot-Analyse fanden die gleichen Proteinrohextrakte aus *Petunia* Verwendung, wobei für die Western Blot-Analyse 10 µg Protein eingesetzt wurden.

7 Literaturverzeichnis

- Aberg B** (1957) Auxin relations in roots. *Annual Review of Plant Physiology* **8**: 153-180
- Acosta IF, Farmer EE** (2010) Jasmonates. *The Arabidopsis Book* **8**: 1-13
- Adams DO, Yang SF** (1979) Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 170-174
- Agrawal GK, Jwa N-S, Agrawal SK, Tamogami S, Iwahashi H, Rakwal R** (2003) Cloning of novel rice allene oxide cyclase (OsAOC): mRNA expression and comparative analysis with allene oxide synthase (OsAOS) gene provides insight into the transcriptional regulation of octadecanoid pathway biosynthetic genes in rice. *Plant Science* **164**: 979-992
- Ahkami AH, Lischewski S, Haensch K-T, Porfirova S, Hofmann J, Rolletschek H, Melzer M, Franken P, Hause B, Druge U, Hajirezaei MR** (2009) Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: Involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist* **181**: 613-625
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Altman A, Wareing PF** (1975) The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of ¹⁴C-labelled assimilates in relation to root formation in *Phaseolus vulgaris* cuttings. *Physiologia Plantarum* **33**: 32-38
- Andersen AS** (1977) Ethylene and root initiation in cuttings. In Kudrev T, ed, *Plant Growth Regulators*. Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, pp 524-530
- Ando T, Nomura M, Tsukahara J, Watanabe H, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E, Kitching IJ** (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (*Solanaceae*). *Annals of Botany* **88**: 403-413
- Apelbaum A, Yang SF** (1981) Biosynthesis of stress ethylene induced by water deficit. *Plant Physiology* **68**: 594-596
- Attfield EM, Evans PK** (1991) Developmental pattern of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. *Journal of Experimental Botany* **42**: 51-57
- Bachelard EP, Stowe BB** (1962) A possible link between root initiation and anthocyanin formation. *Nature* **194**: 209-210
- Baldwin IT, Zhang Z-P, Diab N, Ohnmeiss TE, McCloud ES, Lynds GY, Schmelz EA** (1997) Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **201**: 397-404
- Basu RN, Roy BN, Bose TK** (1970) Interaction of abscisic acid and auxins in rooting of cuttings. *Plant and Cell Physiology* **11**: 681-684
- Batten DJ, Mullins MG** (1978) Ethylene and adventitious root formation in hypocotyl segments of etiolated mung-bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) seedlings. *Planta* **138**: 193-197
- Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje AR, Gerats AGM** (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: Partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Molecular Biology* **13**: 491-502
- Belles JM, Conejero V, Duran-Vila N, Granell A** (1989) ACC synthesis as the activated step responsible for the rise of ethylene production accompanying *Citrus exocortis* viroid infection in tomato plants. *Journal of Phytopathology* **125**: 198-208

- Bergey D, Ryan C** (1999) Wound- and systemin-inducible *calmodulin* gene expression in tomato leaves. *Plant Molecular Biology* **40**: 815-823
- Bergey DR, Howe GA, Ryan CA** (1996) Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 12053-12058
- Besseau Sb, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M** (2007) Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *The Plant Cell* **19**: 148-162
- Beyer EM** (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology* **58**: 268-271
- Bhattacharya NC, Kumar A** (1980) Physiological and biological studies associated with adventitious root formation in *Phaseolus mungo* L. in relation to auxin-phenol synergism. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **175**: 421-435
- Bingham IJ, Blackwood JM, Stevenson EA** (1997) Site, scale and time-course for adjustments in lateral root initiation in wheat following changes in C and N supply. *Annals of Botany* **80**: 97-106
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geisler M, Nagashima A, Sakai T, Martinoia E, Friml J, Peer WA, Murphy AS** (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-Glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 131-147
- Blazich FA, Heuser CW** (1979) A histological study of adventitious root initiation in mung bean cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **104**: 63-67
- Blée E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* **7**: 315-322
- Bleecker AB, Kende H** (2000) Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* **16**: 1-18
- Boller T, Herner RC, Kende H** (1979) Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* **145**: 293-303
- Bollmark M, Eliasson L** (1986) Effects of exogenous cytokinins on root formation in pea cuttings. *Physiologia Plantarum* **68**: 662-666
- Bollmark M, Eliasson L** (1990) Ethylene accelerates the breakdown of cytokinins and thereby stimulates rooting in Norway spruce hypocotyl cuttings. *Physiologia Plantarum* **80**: 534-540
- Bollmark M, Kubat B, Eliasson L** (1988) Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. *Journal of Plant Physiology* **132**: 262-265
- Bouquin T, Lasserre E, Pradier J, Pech J-C, Balagué C** (1997) Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene *CM-ACO1* occurs via two direct and independent transduction pathways. *Plant Molecular Biology* **35**: 1029-1035
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Brash AR, Baertschi SW, Ingram CD, Harris TM** (1988) Isolation and characterization of natural allene oxides: Unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 3382-3386
- Browse J** (2009) Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 183-205
- Brunner H** (1977) Einfluss verschiedener Wuchsstoffe und Stoffwechselgifte auf Atmung und Zuckergehalt in dem wurzelregenerierenden Gewebe von *Phaseolus vulgaris* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **82**: 28-44
- Brunner H** (1978) Einfluss verschiedener Wuchsstoffe und Stoffwechselgifte auf wurzelregenerierende Gewebe von *Phaseolus vulgaris* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **88**: 13-23

- Bucher D, Pilet PE** (1983) Auxin effects on root growth and ethylene production. *Cellular and Molecular Life Sciences* **39**: 493-494
- Bufler G, Mor Y, Reid MS, Yang SF** (1980) Changes in 1-aminocyclopropane-l-carboxylic-acid content of cut carnation flowers in relation to their senescence. *Planta* **150**: 439-442
- Bui AQ, Neill SDO** (1998) Three *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase* genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. *Plant Physiology* **116**: 419-428
- Burg SP, Burg EA** (1967) Inhibition of polar auxin transport by ethylene. *Plant Physiology* **42**: 1224-1228
- Calderon-Villalobos LIA, Kuhnle C, Li H, Rosso M, Weisshaar B, Schwechheimer C** (2006) LucTrap vectors are tools to generate luciferase fusions for the quantification of transcript and protein abundance *in vivo*. *Plant Physiology* **141**: 3-14
- Cameron C, Fenton CAL, Yu Y, Adams DO, Yang SF** (1979) Increased production of ethylene by plant tissues treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *HortScience* **14**: 178-180
- Cameron RJ, Thomson GV** (1969) The vegetative propagation of *Pinus radiata*: Root initiation in cuttings. *Botanical Gazette* **130**: 242-251
- Castel R, Kusters E, Koes R** (2010) Inflorescence development in *Petunia*: Through the maze of botanical terminology. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2235-2246
- Castillo MC, Martinez C, Buchala AJ, Metraux JP, Leon J** (2004) Gene-specific involvement of β -oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**: 85-94
- Cenzano A, Abdala G, Hause B** (2007) Cytochemical immuno-localization of allene oxide cyclase, a jasmonic acid biosynthetic enzyme, in developing potato stolons. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1449-1456
- Cenzano A, Vigliocco A, Miersch O, Abdala G** (2005) Hydroxylated jasmonate levels during stolon to tuber transition in *Solanum tuberosum* L. *Potato Research* **48**: 107-115
- Chadwick AV, Burg SP** (1967) An explanation of the inhibition of root growth caused by indole-3-acetic acid. *Plant Physiology* **42**: 415-420
- Chandra GR, Gregory LE, Worley JF** (1971) Studies on the initiation of adventitious roots on mung bean hypocotyl. *Plant and Cell Physiology* **12**: 317-324
- Chao WS, Gu Y-Q, Pautot V, Bray EA, Walling LL** (1999) Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiology* **120**: 979-992
- Chen H, Wilkerson CG, Kuchar JA, Phinney BS, Howe GA** (2005) Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 19237-19242
- Chen Y-C, Siems WF, Pearce G, Ryan CA** (2008) Six peptide wound signals derived from a single precursor protein in *Ipomoea batatas* leaves activate the expression of the defense gene sporamin. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 11469-11476
- Chibbar RN, Gurumurti K, Nanda KK** (1978) Changes in IAA oxidase activity in rooting hypocotyl cuttings of *Phaseolus mungo* L. *Experientia* **35**: 202-203
- Chin T-Y, Meyer MM, Beevers L** (1969) Abscisic-acid-stimulated rooting of stem cuttings. *Planta* **88**: 192-196
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671
- Christianson ML, Warnick DA** (1983) Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Developmental Biology* **95**: 288-293

- Chung HS, Howe GA** (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-Domain protein JAZ10 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 131-145
- Chung HS, Koo AJK, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones AD, Howe GA** (2008) Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology* **146**: 952-964
- Clark DG, Dervinis C, Barrett JE, Klee H, Jones M** (2004) Drought-induced leaf senescence and horticultural performance of transgenic PSAG12-IPT *Petunias*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**: 93-99
- Clark DG, Gubrium EK, Barrett JE, Nell TA, Klee HJ** (1999) Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology* **121**: 53-59
- Coleman WK, Huxter TJ, Reid DM, Thorpe TA** (1980) Ethylene as an endogenous inhibitor of root regeneration in tomato leaf discs cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* **48**: 519-525
- Conconi A, Miquel M, Browse JA, Ryan CA** (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiology* **111**: 797-803
- Creelman RA, Mullet JE** (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4114-4119
- Curtis MD, Grossniklaus U** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes *in planta*. *Plant Physiology* **133**: 462-469
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R** (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**: 5-17
- Dathe W, Rönch H, Preiss A, Schade W, Sembdner G, Schreiber K** (1981) Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* **153**: 530-535
- Davies FT, Davis TD, Kester DE** (1994) Commercial importance of adventitious rooting to horticulture. In Davis TD, Haissig BE, eds, *Biology of Adventitious Root Formation*. Plenum Press, New York, pp 53-59
- De Keuleleire P, Maes T, Sauer M, Zethof J, Van Montagu M, Gerats T** (2001) Analysis by transposon display of the behavior of the dTph1 element family during ontogeny and inbreeding of *Petunia hybrida*. *Molecular Genetics and Genomics* **265**: 72-81
- De Klerk GJ, Arnholdt-Schmitt B, Lieberei R, Neumann KH** (1997) Regeneration of roots, shoots and embryos: Physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* **39**: 53-66
- De Klerk GJ, Keppel M, Brugge JT, Meekes H** (1995) Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *Journal of Experimental Botany* **46**: 965-972
- De Klerk GJ, van der Krieken W, de Jong JC** (1999) The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular und Developmental Biology* **35**: 189-199
- del Pozo JC, Estelle M** (2000) F-box proteins and protein degradation: An emerging theme in cellular regulation. *Plant Molecular Biology* **44**: 123-128
- Delker C, Stenzel I, Hause B, Miersch O, Feussner I, Wasternack C** (2006) Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, products, regulation. *Plant Biology* **8**: 297-306
- Delker C, Zolman BK, Miersch O, Wasternack C** (2007) Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* requires peroxisomal β -oxidation enzymes - Additional proof by properties of *pex6* and *aim1*. *Phytochemistry* **68**: 1642-1650
- Demkura PV, Abdala G, Baldwin IT, Ballare CL** (2010) Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology* **152**: 1084-1095

- Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang HS, Chilcott C, Zhu T, Turner J** (2005) Expression profiling reveals *COI1* to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58**: 497-513
- Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M, Turner JG** (2002) *COI1* links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin–ligase complex in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **32**: 457-466
- Dicke M, Agrawal AA, Bruin J** (2003) Plants talk, but are they deaf? *Trends in Plant Science* **8**: 403-405
- Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA** (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4095-4098
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM, Kazan K** (2007) *MYC2* differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 2225-2245
- Doodeman M, Bianchi F** (1985) Genetic analysis of instability in *Petunia hybrida*. *Theoretical and Applied Genetics* **69**: 297-304
- dos Reis C, das Graças Sajo M, Stehmann JR** (2002) Leaf structure and taxonomy of *Petunia* and *Calibrachoa* (*Solanaceae*). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **45**: 59 - 66
- Dubucq M, Hofinger M, Gaspar T** (1978) Auxin controlled root growth and ethylene production. *Plant, Cell & Environment* **1**: 151-153
- Eliasson L** (1978) Effects of nutrients and light on growth and root formation in *Pisum sativum* cuttings. *Physiologia Plantarum* **43**: 13-18
- Eliasson L** (1981) Factors affecting the inhibitory effect of indolylacetic acid on root formation in pea cuttings. *Physiologia Plantarum* **51**: 23-26
- Eliasson L, Areblad K** (1984) Auxin effects on rooting in pea cuttings. *Physiologia Plantarum* **61**: 293-297
- Eliasson L, Bertell G, Bolander E** (1989) Inhibitory Action of Auxin on Root Elongation Not Mediated by Ethylene. *Plant Physiology* **91**: 310-314
- Ellis C, Turner JG** (2001) The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *The Plant Cell* **13**: 1025-1033
- Ellis C, Turner JG** (2002) A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* **215**: 549-556
- Eriksen EN** (1974) Root formation in pea cuttings. III. The influence of cytokinin at different developmental stages. *Physiologia Plantarum* **30**: 163-167
- Exposito-Rodriguez M, Borges A, Borges-Perez A, Perez J** (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology* **8**: 131
- Fabbri AA, Fanelli C, Reverberi M, Ricelli A, Camera E, Urbanelli S, Rossini A, Picardo M, Altamura MM** (2000) Early physiological and cytological events induced by wounding in potato tuber. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1267-1275
- Fabijan D, Taylor JS, Reid DM** (1981) Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **53**: 589-597
- Falkenstein E, Groth B, Mithöfer A, Weiler EW** (1991) Methyljasmonate and α -linolenic acid are potent inducers of tendril coiling. *Planta* **185**: 316-322
- Farmaki T, Sanmartin M, Jimenez P, Paneque M, Sanz C, Vancanneyt G, Leon J, Sanchez-Serrano JJ** (2007) Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* **58**: 555-568

- Farmer EE, Johnson RR, Ryan CA** (1992) Regulation of expression of *Proteinase Inhibitor* genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology* **98**: 995-1002
- Farmer EE, Ryan CA** (1990) Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7713-7716
- Farmer EE, Ryan CA** (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell* **4**: 129-134
- Fedina I, Nedeva D, Georgieva K, Velitchkova M** (2009) Methyl jasmonate counteract UV-B stress in barley seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science* **195**: 204-212
- Fernqvist I** (1966) Studies on factors in adventitious root formation. *Lantbrukshögskolans Annaler* **32**: 109-244
- Ferrario S, Shchennikova AV, Franken J, Immink RGH, Angenent GC** (2006) Control of floral meristem determinacy in *Petunia* by MADS-box transcription factors. *Plant Physiology* **140**: 890-898
- Feussner I, Wasternack C** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 275-297
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R** (2009) (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**: 344-350
- Fortes AM, Miersch O, Lange PR, Malho R, Testillano PS, Risueno MdC, Wasternack C, Pais MS** (2005) Expression of allene oxide cyclase and accumulation of jasmonates during organogenic nodule formation from hop (*Humulus lupulus* var. Nugget) internodes. *Plant and Cell Physiology* **46**: 1713-1723
- Froehlich JE, Itoh A, Howe GA** (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology* **125**: 306-317
- Galliano H, Müller AE, Lucht JM, Meyer P** (1995) The transformation booster sequence from *Petunia hybrida* is a retrotransposon derivative that binds to the nuclear scaffold. *Molecular and General Genetics* **247**: 614-622
- Garg R, Sahoo A, Tyagi AK, Jain M** (2010) Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396**: 283-288
- Garrido G, Ramon Guerrero J, Angel Cano E, Acosta M, Sanchez-Bravo J** (2002) Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiologia Plantarum* **114**: 303-312
- Gaspar T, Coumans M** (1987) Root formation. In Bonga JM, Durzan DJ, eds, *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol 2. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp 202-217
- Gaspar T, Moncousin C, Greppin H** (1990) The place and role of exogenous and endogenous auxin in adventitious root formation. Intra- and intercellular communications in plants: Reception, transmission, storage and expression of messages. INRA Paris: 125-139
- Geldner N, Friml J, Stierhof Y-D, Jurgens G, Palme K** (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**: 425-428
- Geneve RL, Heuser CW** (1982) The effect of IAA, IBA, NAA and 2,4-D on root promotion and ethylene evolution in *Vigna radiata* cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **107**: 202-205
- Geneve RL, Heuser CW** (1983) The relationship between ethephon and auxin on adventitious root initiation in cuttings of *Vigna radiata* (L.) R. Wilcz. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**: 330-333
- Gerats AGM, Beld M, Huits H, Prescott A** (1989) Gene tagging in *Petunia hybrida* using homologous and heterologous transposable elements. *Developmental Genetics* **10**: 561-568

- Gerats AGM, Huits H, Vrijlandt E, Marana C, Souer E, Beld M** (1990) Molecular characterization of a nonautonomous transposable element (dTph1) of *Petunia*. *The Plant Cell* **2**: 1121-1128
- Gerats T, Vandenbussche M** (2005) A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends in Plant Science* **10**: 251-256
- Gidda SK, Miersch O, Levitin A, Schmidt J, Wasternack C, Varin L** (2003) Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 17895-17900
- Gil P, Dewey E, Friml J, Zhao Y, Snowden KC, Putterill J, Palme K, Estelle M, Chory J** (2001) BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **15**: 1985-1997
- Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer EE, Wolfender J-L** (2008) Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 16400-16407
- Godt DE, Roitsch T** (1997) Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiology* **115**: 273-282
- Gonzalez A, Rodriguez R, Sanchez Tames S** (1991) Ethylene and *in vitro* rooting of hazelnut (*Corylus avellana*) cotyledons. *Physiologia Plantarum* **81**: 227-233
- Grechkin AN, Chechetkin IR, Mukhtarova LS, Hamberg M** (2002) Role of structure and pH in cyclization of allene oxide fatty acids: Implications for the reaction mechanism. *Chemistry and Physics of Lipids* **120**: 87-99
- Green TR, Ryan CA** (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science* **175**: 776-777
- Grunewald W, Vanholme B, Pauwels L, Plovie E, Inzé D, Gheysen G, Goossens A** (2009) Expression of the *Arabidopsis* jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Reports* **10**: 923-928
- Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 2389-2393
- Hagen G, Guilfoyle T** (2002) Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* **49**: 373-385
- Hagen G, Guilfoyle TJ** (1985) Rapid induction of selective transcription by auxins. *Molecular and Cellular Biology* **5**: 1197-1203
- Haissig BE** (1970) Influence of indole-3-acetic acid on adventitious root primordia of brittle willow. *Planta* **95**: 27-35
- Hamberg M, Fahlstadius P** (1990) Allene oxide cyclase: A new enzyme in plant lipid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **276**: 518-526
- Hamberg M, Hughes M** (1988) Fatty acid allene oxides. III. Albumin-induced cyclization of 12,13(S)-epoxy-9(Z),11-octadecadienoic acid. *Lipids* **23**: 469-475
- Hamberg M, Ponce de Leon I, Rodriguez MJ, Castresana C** (2005) α -Dioxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**: 169-174
- Hansen J, Stromquist L-H, Ericsson A** (1978) Influence of the irradiance on carbohydrate content and rooting of cuttings of pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Physiology* **61**: 975-979
- Hartung W, Ohl B, Kummer V** (1980) Abscisic acid and the rooting of runner bean cuttings. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **98**: 95-103

- Hause B, Hause G, Kutter C, Miersch O, Wasternack C** (2003a) Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant and Cell Physiology* **44**: 643-648
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D** (2007) Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* **68**: 101-110
- Hause B, Stenzel I, Miersch O, Maucher H, Kramell R, Ziegler J, Wasternack C** (2000) Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers - allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *The Plant Journal* **24**: 113-126
- Hause B, Stenzel I, Miersch O, Wasternack C** (2003b) Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **64**: 971-980
- Hausman JF, Evers D, Kevers C, Gaspar T** (1997) Internal controls of root induction in poplar shoots raised *in vitro*. *Angewandte Botanik* **71**: 104-107
- Hayashi M, Nito K, Takei-Hoshi R, Yagi M, Kondo M, Suenaga A, Yamaya T, Nishimura M** (2002) Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid β -oxidation. *Plant and Cell Physiology* **43**: 1-11
- Heide OM** (1965) Interaction of temperature, auxins and kinins in the regeneration ability of *Begonia* leaf cuttings. *Physiologia Plantarum* **18**: 891-920
- Heide OM** (1968) Stimulation of adventitious bud formation in *Begonia* leaves by abscisic acid. *Nature* **219**: 960-961
- Heil M** (2008) Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* **178**: 41-61
- Heil M, Koch T, Hilpert A, Fiala B, Boland W, Linsenmair KE** (2001) Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 1083-1088
- Heil M, McKey D** (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**: 425-553
- Heil M, Ton J** (2008) Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science* **13**: 264-272
- Heitz T, Bergey DR, Ryan CA** (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* **114**: 1085-1093
- Helder H, Miersch O, Vreugdenhil D, Sembdner G** (1993) Occurrence of hydroxylated jasmonic acids in leaflets of *Solanum demissum* plants grown under long- and short-day conditions. *Physiologia Plantarum* **88**: 647-653
- Herde O, Atzorn R, Fisahn J, Wasternack C, Willmitzer L, Pena-Cortes H** (1996) Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiology* **112**: 853-860
- Hill-Ambroz KL, Brown-Guedira GL, Fellers JP** (2002) Modified rapid DNA extraction protocol for high throughput microsatellite analysis in wheat. *Crop Science* **42**: 2088-2091
- Hoballah ME, Gubitza T, Stuurman J, Broger L, Barone M, Mandel T, Dell'Olivo A, Arnold M, Kuhlemeier C** (2007) Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *The Plant Cell* **19**: 779-790
- Hofmann E, Zerbe P, Schaller F** (2006) The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* allene oxide cyclase: Insights into the oxylipin cyclization reaction. *The Plant Cell* **18**: 3201-3217
- Hong JH, Cowan AK, Koo Lee S** (2004) Glucose inhibits ACC oxidase activity and ethylene biosynthesis in ripening tomato fruit. *Plant Growth Regulation* **43**: 81-87
- Howe GA, Jander G** (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 41-66
- Howe GA, Lee GI, Itoh A, Li L, DeRocher AE** (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiology* **123**: 711-724

- Huits HSM, Wijsman HJW, Koes RE, Gerats AGM** (1995) Genetic characterisation of *Act1*, the activator of a non-autonomous transposable element from *Petunia hybrida*. *Theoretical and Applied Genetics* **91**: 110-117
- Humphries EC** (1960) Inhibition of root development on petioles and hypocotyls of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*) by kinetin. *Physiologia Plantarum* **13**: 659-663
- Isayenkov S, Mrosk C, Stenzel I, Strack D, Hause B** (2005) Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiology* **139**: 1401-1410
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K** (2001) The *DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**: 2191-2209
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP** (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345**: 646-651
- James DJ** (1983) Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M.9. *Physiologia Plantarum* **57**: 149-153
- Jarvis BC** (1986) Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In Jackson MB, ed, *New Root Formation in Plants and Cuttings*, Vol 20. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 191-222
- Jarvis BC, Ali AHN, Shaheed AI** (1983) Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cuttings. *New Phytologist* **95**: 509-518
- Jusaitis M** (1986) Rooting response of mung bean cuttings to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and inhibitors of ethylene biosynthesis. *Scientia Horticulturae* **29**: 77-85
- Kantharaj GR, Mahadevan S, Padmanaban G** (1979) Early biochemical events during adventitious root initiation in the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* **18**: 383-387
- Kappers IF, Verstappen FWA, Luckerhoff LLP, Bouwmeester HJ, Dicke M** (2010) Genetic variation in jasmonic acid- and spider mite-induced plant volatile emission of cucumber accessions and attraction of the predator *Phytoseiulus persimilis*. *Journal of Chemical Ecology* **36**: 500-512
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA** (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 7100-7105
- Kefford NP** (1973) Effect of hormone antagonist on the rooting of shoot cuttings. *Plant Physiology* **51**: 214-216
- Kevers C, Hausman JF, Faivre-Rampant O, Evers D, Gaspar T** (1997) Hormonal control of adventitious rooting: Progress and questions (Hormonale Kontrolle der Adventivwurzelbildung). *Angewandte Botanik* **71**: 71-79
- Kienow L, Schneider K, Bartsch M, Stuible H-P, Weng H, Miersch O, Wasternack C, Kombrink E** (2008) Jasmonates meet fatty acids: Functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **59**: 403-419
- Kim EH, Park SH, Kim JK** (2009) Methyl jasmonate triggers loss of grain yield under drought stress. *Plant Signaling and Behavior* **4**: 348-349
- Kim Y-S, Yeung E, Hahn E-J, Paek K-Y** (2007) Combined effects of phytohormone, indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Biotechnology Letters* **29**: 1789-1792
- Kleen D** (2007) Zell- und gewebetypische Expression der Allenoxydicyclase in *Petunia hybrida*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität, Halle

- Klopotek Y, Haensch K-T, Hause B, Hajirezaei M-R, Druege U** (2010) Dark exposure of *Petunia* cuttings strongly improves adventitious root formation and enhances carbohydrate availability during rooting in the light. *Journal of Plant Physiology* **167**: 547-554
- Koch KE** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 509-540
- Koch T, Bandemer K, Boland W** (1997) Biosynthesis of *cis*-jasmonate: A pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helvetica Chimica Acta* **80**: 838-850
- Koes R, Souer E, van Houwelingen A, Mur L, Spelt C, Quattrocchio F, Wing J, Oppedijk B, Ahmed S, Maes T** (1995) Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 8149-8153
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of *TL-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
- Kong FJ, Li Y, Abe J, Liu B, Schaller F, Piotrowski M, Otagaki S, Takahashi K, Matsuura H, Yoshihara T, Nabeta K** (2009) Expression of allene oxide cyclase from *Pharbitis nil* upon theobroxide treatment. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry* **73**: 1007-1013
- Konings H, Jackson MB** (1979) A relationship between rates of ethylene production by roots and the promoting or inhibiting effects of exogenous ethylene and water on root elongation. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **92**: 385-397
- Koo AJK, Chung HS, Kobayashi Y, Howe GA** (2006) Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 33511-33520
- Koo AJK, Gao X, Daniel Jones A, Howe GA** (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **59**: 974-986
- Koo AJK, Howe GA** (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**: 1571-1580
- Koukourikou-Petridou MA, Bangerth F** (1997) Effect of changing the endogenous concentration of auxins and cytokinins and the production of ethylene in pea stem cuttings on adventitious root formation. *Plant Growth Regulation* **22**: 101-108
- Kramell R, Atzorn R, Schneider G, Miersch O, Brückner C, Schmidt J, Sembdner G, Parthier B** (1995) Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Journal of Plant Growth Regulation* **14**: 29-36
- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wasternack C** (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "Oxylipin Signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology* **123**: 177-188
- Krishnamoorthy HN** (1970) Promotion of rooting in mung bean hypocotyl cuttings with ethrel, an ethylene releasing compound. *Plant and Cell Physiology* **11**: 979-982
- Krishnamoorthy HN** (1972) Effect of growth retardants and abscisic acid on the rooting of hypocotyl cuttings of muskmelon (*Cucumis melo* cv. Kutana). *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **163**: 513-517
- Kuroha T, Ueguchi C, Sakakibara H, Satoh S** (2006) Cytokinin receptors are required for normal development of auxin-transporting vascular tissues in the hypocotyl but not in adventitious roots. *Plant and Cell Physiology* **47**: 234-243
- Kyhse-Andersen J** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **10**: 203-209
- Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F, Holländer-Czytko H, Weiler EW** (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Molecular Biology* **31**: 323-335

- Laudert D, Schaller F, Weiler EW** (2000) Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* **211**: 163-165
- Laudert D, Weiler EW** (1998) Allene oxide synthase: A major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *The Plant Journal* **15**: 675-684
- Le J, Vandebussche F, Van Der Straeten D, Verbelen J-P** (2001) In the early response of *Arabidopsis* roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. *Plant Physiology* **125**: 519-522
- Lee GI, Howe GA** (2003) The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *The Plant Journal* **33**: 567-576
- Li C, Schillmiller AL, Liu G, Lee GI, Jayanty S, Sageman C, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Yagi K, Kobayashi Y, Howe GA** (2005) Role of β -Oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell* **17**: 971-986
- Li L, Li C, Lee G, Howe G** (2002) Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 6416-6421
- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA** (2004) The tomato homolog of *CORONATINE-INSENSITIVE1* is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *The Plant Cell* **16**: 126-143
- Li SW, Xue L, Xu S, Feng H, An L** (2009) Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *The Botanical Review* **75**: 230-247
- Libbert E, Krelle E** (1966) Die Wirkung des »Gibberellinantagonisten« 2-Chloräthyltrimethylammoniumchlorid (CCC) auf die Stecklingsbewurzelung windender und nicht windender Pflanzen. *Planta* **70**: 95-98
- Linkins AE, Lewis LN, Palmer RL** (1973) Hormonally Induced Changes in the Stem and Petiole Anatomy and Cellulase Enzyme Patterns in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **52**: 554-560
- Liu J, Mukherjee I, Reid M** (1990) Adventitious rotting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. III. The role of ethylene. *Physiologia Plantarum* **78**: 268-276
- Liu JH, Reid DM** (1992a) Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. IV. The role of changes in endogenous free and conjugated indole-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum* **86**: 285-292
- Liu JH, Reid DM** (1992b) Auxin and ethylene-stimulated adventitious rooting in relation to tissue sensitivity to auxin and ethylene production in sunflower hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **43**: 1191-1198
- Lorbiecke R, Sauter M** (1999) Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice. *Plant Physiology* **119**: 21-30
- Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R** (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 1938-1950
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano J, Solano R** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell* **15**: 165-178
- Lovell PH, Illsley A, Moore KG** (1973) The effect of sucrose on primordium development and on protein and RNA levels in detached cotyledons of *Sinapis alba* L. *Annals of Botany* **37**: 805-816
- Lovell PH, Illsley ANN, Moore KG** (1972) The effects of light intensity and sucrose on root formation, photosynthetic ability, and senescence in detached cotyledons of *Sinapis alba* L. and *Raphanus sativus* L. *Annals of Botany* **36**: 123-134
- Lovell PH, White J** (1986) Anatomical changes during adventitious root formation *In* Jackson MB, ed, *New Root Formation in Plants and Cuttings*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 111-140

- Ludwig-Müller J, Vertocnik A, Town CD** (2005) Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2095-2105
- Lund ST, Smith AG, Hackett WP** (1996) Cuttings of a tobacco mutant, *rae*, undergo cell divisions but do not initiate adventitious roots in response to exogenous auxin. *Physiologia Plantarum* **97**: 372-380
- Lutke WK** (2006) *Petunia* (*Petunia hybrida*). *Methods in Molecular Biology* **344**: 339-349
- MacRae DH, Bonner J** (1953) Chemical structure and antiauxin activity. *Physiologia Plantarum* **6**: 485-510
- Maes T, Van de Steene N, Zethof J, Karimi M, D'Hauw M, Mares G, Van Montagu M, Gerats T** (2001) *Petunia* *Ap2-like* genes and their role in flower and seed development. *The Plant Cell* **13**: 229-244
- Mahlstede JP, Watson DP** (1952) An anatomical study of adventitious root development in stems of *Vaccinium corymbosum*. *Botanical Gazette* **113**: 279-285
- Maldiney R, Pelese F, Pilate G, Sotta B, Sossountzov L, Miginiac E** (1986) Endogenous levels of abscisic acid, indole-3-acetic acid, zeatin and zeatin-riboside during the course of adventitious root formation in cuttings of *Craigella* and *Craigella* lateral suppressor tomatoes. *Physiologia Plantarum* **68**: 426-430
- Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M** (2010) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology* **10**: 4
- Marx P** (2003) Untersuchungen zur Vermehrbarkeit und zur Wachstumsregulierung von neu in den europäischen Markt einführbaren australischen Pflanzen am Beispiel von *Acacia*. Dissertation. Humboldt-Universität, Berlin
- Maucher H, Hause B, Feussner I, Ziegler J, Wasternack C** (2000) Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): Tissue specific regulation in seedling development. *The Plant Journal* **21**: 199-213
- Maucher H, Stenzel I, Miersch O, Stein N, Prasa M, Zierold U, Schweizer P, Dorer C, Hause B, Wasternack C** (2004) The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.) - Cloning and organ-specific expression. *Phytochemistry* **65**: 801-811
- McConn M, Browse J** (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell* **8**: 403-416
- McGurl B, Pearce G, Orozco-Cardenas M, Ryan CA** (1992) Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* **255**: 1570-1573
- Melotto M, Mecey C, Niu Y, Chung HS, Katsir L, Yao J, Zeng W, Thines B, Staswick P, Browse J, Howe GA, He SY** (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *In*, Vol 55, pp 979-988
- Meyer A, Miersch O, Büttner C, Dathe W, Sembdner G** (1984) Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *Journal of Plant Growth Regulation* **3**: 1-8
- Meyer P** (2000) Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant Molecular Biology* **43**: 221-234
- Meyer P** (2001) Chromatin remodelling. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 457-462
- Mielke K, Forner S, Kramell R, Conrad U, Hause B** (2011) Cell-specific visualization of jasmonates in wounded tomato and *Arabidopsis* leaves using jasmonate-specific antibodies. *New Phytologist* **190**: 1069-1080
- Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C** (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist* **177**: 114-127
- Miersch O, Wasternack C** (2000) Octadecanoid and jasmonate signaling in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves: Endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biological Chemistry* **381**: 715-718

- Miersch O, Weichert H, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Feussner I, Wasternack C** (2004) Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves. *Phytochemistry* **65**: 847-856
- Mitsubishi-Kato M, Shibaoka H, Shimokoriyama M** (1978) Anatomical and physiological aspects of developmental processes of adventitious root formation in *Azukia* cuttings. *Plant and Cell Physiology* **19**: 393-400
- Mohammed S, Eriksen EN** (1974) Root formation in pea cuttings. IV. Further studies on the influence of indole-3-acetic acid at different developmental stages. *Physiologia Plantarum* **32**: 94-96
- Moncousin C, Favre JM, Gaspar T** (1988) Changes in peroxidase activity and endogenous IAA levels during adventitious root formation in vine cuttings. In Kutacek M, Bandurski RS, Krekule J, eds, *Physiology and Biochemistry of Auxins in Plants*. Academia, Praha, pp 331-337
- Moncousin C, Favre JM, Gaspar T** (1989) Early changes in auxin and ethylene production in vine cuttings before adventitious rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **19**: 235-242
- Moon J, Parry G, Estelle M** (2004) The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *The Plant Cell* **16**: 3181-3195
- Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M** (1997) Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *The Plant Cell* **9**: 2243-2259
- Mudge KW** (1988) Effect of ethylene on rooting. In Davis TD, Haissig BE, Sankhla N, eds, *Adventitious Root Formation in Cuttings*. Advances in Plant Sciences. Dioscorides Press, Portland, pp 150-161
- Mudge KW, Swanson BT** (1978) Effect of ethephon, indole butyric acid, and treatment solution pH on rooting and on ethylene levels within mung bean cuttings. *Plant Physiology* **61**: 271-273
- Mueller MJ** (2004) Archetype signals in plants: The phytoprostanes. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 441-448
- Mullins MG** (1970a) Auxin and ethylene in adventitious root formation in *Phaseolus aureus*. In Carr D, ed, *Plant Growth Substances*. Springer-Verlag, New York, pp 526-533
- Mullins MG** (1970b) Hormone-directed transport of assimilates in decapitated internodes of *Phaseolus vulgaris* L. *Annals of Botany* **34**: 897-909
- Nagel KA, Schurr U, Walter A** (2006) Dynamics of root growth stimulation in *Nicotiana tabacum* in increasing light intensity. *Plant, Cell und Environment* **29**: 1936-1945
- Naija S, Elloumi N, Jbir N, Ammar S, Kevers C** (2008) Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. *Comptes Rendus Biologies* **331**: 518-525
- Nanda KK, Jain MK** (1971) Interaction effects of glucose and auxins in rotting etiolated stem segments of *Salix tetrasperma*. *New Phytologist* **70**: 945-948
- Nanda KK, Jain MK, Malhotra S** (1971) Effect of glucose and auxins in rooting etiolated stem segments of *Populus nigra*. *Physiologia Plantarum* **24**: 387-391
- Naoumkina M, Farag MA, Sumner LW, Tang Y, Liu CJ, Dixon RA** (2007) Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 17909-17915
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R** (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* **2**: 279-289
- Narvaez-Vasquez J, Florin-Christensen J, Ryan CA** (1999) Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *The Plant Cell* **11**: 2249-2260
- Negi S, Ivanchenko MG, Muday GK** (2008) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **55**: 175-187

- Negi S, Sukumar P, Liu X, Cohen JD, Muday GK** (2010) Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *The Plant Journal* **61**: 3-15
- Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D** (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2907-2914
- Niehues R** (2009) Die wichtigsten Pflanzen im grünen Einzelhandel. *DEGA Produktion & Handel* **4**: 12-13
- Nordström AC, Eliasson L** (1984) Regulation of root formation by auxin-ethylene interaction in pea stem cuttings. *Physiologia Plantarum* **61**: 298-302
- Nordström AC, Eliasson L** (1991) Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspatic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Physiologia Plantarum* **82**: 599-605
- Nordström AC, Eliasson L** (1993) Interaction of ethylene with indole-3-acetic acid in regulation of rooting in pea cuttings. *Plant Growth Regulation* **12**: 83-90
- Nordström AC, Jacobs FA, Eliasson L** (1991) Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology* **96**: 856-861
- Norman-Setterblad C, Vidal S, Palva ET** (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 430-438
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ** (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**: 1914-1917
- Okoro OO, Grace J** (1976) The physiology of rooting *Populus* cuttings. I. Carbohydrates and photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **36**: 133-138
- Okoro OO, Grace J** (1978) The physiology of rooting *Populus* cuttings. II. Cytokinin activity in leafless hardwood cuttings. *Physiologia Plantarum* **44**: 167-170
- Olmstead RG, Bohs L** (2007) A summary of molecular systematic research in *Solanaceae*: 1982-2006. In Spooner D, ed, *Solanaceae VI : Genomics Meets Biodiversity*, Vol 745. ISHS Acta Horticulturae
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF, Collier SM** (2008) A molecular phylogeny of the *Solanaceae*. *TAXON* **57**: 1159-1181
- Oono Y, Ooura C, Rahman A, Aspuria ET, Hayashi K-i, Tanaka A, Uchimiya H** (2003) *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiology* **133**: 1135-1147
- Orlova I, Marshall-Colon A, Schnepf J, Wood B, Varbanova M, Fridman E, Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS, Rhodes D, Pichersky E, Dudareva N** (2006) Reduction of benzenoid synthesis in *Petunia* flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport. *The Plant Cell* **18**: 3458-3475
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA** (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6553-6557
- Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Ryan CA** (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* **13**: 179-191
- Overbeek Jv, Solon AG, Gregory LE** (1946) An analysis of the function of the leaf in the process of root formation in cuttings. *American Journal of Botany* **33**: 100-107
- Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H, Kangasjärvi J** (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *The Plant Cell* **12**: 1849-1862

- Park JH, Halitschke R, Kim HB, Baldwin IT, Feldmann KA, Feyereisen R** (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal* **31**: 1-12
- Patrick JW, Wareing PF** (1973) Auxin-promoted transport of metabolites in stems of *Phaseolus vulgaris* L.: Some characteristics of the experimental transport systems. *Journal of Experimental Botany* **24**: 1158-1171
- Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA** (2001) Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature* **411**: 817-820
- Pearce G, Siems WF, Bhattacharya R, Chen YC, Ryan CA** (2007) Three hydroxyproline-rich glycopeptides derived from a single *Petunia* polyprotein precursor activate *defensin I*, a pathogen defense response gene. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 17777-17784
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA** (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 895-897
- Pedranzani H, Sierra-de-Grado R, Vigliocco A, Miersch O, Abdala G** (2007) Cold and water stresses produce changes in endogenous jasmonates in two populations of *Pinus pinaster* Ait. *Plant Growth Regulation* **52**: 111-116
- Pelacho AM, Pérez-Catalan J, Martín-Closas LI** (1997) Root development in *in vitro* potato explants as affected by jasmonic acid. In Altman A, Waisel Y, eds, *Biology of Root Formation and Development*, Plenum Press, New York, pp 141-145
- Pena-Cortes H, Fisahn J, Willmitzer L** (1995) Signals involved in wound-induced *proteinase inhibitor II* gene expression in tomato and potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4106-4113
- Penninckx I, Eggermont K, Terras FRG, Thomma B, Samblanx GWD, Buchala A, Métraux JP, Manners JM, Broekaert WF** (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* **8**: 2309-2323
- Penninckx I, Thomma B, Buchala A, Métraux J-P, Broekaert W** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**: 2103-2113
- Pierik RLM** (1972) Adventitious root formation in isolated petiole segments of *Lunaria annua* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **66**: 343-351
- Pierik RLM, Steegmans HHM** (1975) Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. *Scientia Horticulturae* **3**: 1-20
- Proels RK, Roitsch T** (2009) Extracellular invertase LIN6 of tomato: A pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1555-1567
- Radhika V, Kost C, Mithöfer A, Boland W** (2010) Regulation of extrafloral nectar secretion by jasmonates in lima bean is light dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
- Rahman A, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S** (2001) Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated response in the growth of *Arabidopsis* roots. *Plant and Cell Physiology* **42**: 301-307
- Rakwal R, Tamogami S, Agrawal GK, Iwahashi H** (2002) Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **295**: 1041-1045
- Rao MV, Lee HI, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR** (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell* **12**: 1633-1646
- Rausser WE, Horton RF** (1975) Rapid Effects of Indoleacetic Acid and Ethylene on the Growth of Intact Pea Roots. *Plant Physiology* **55**: 443-447

- Reverberi M, Fanelli C, Zjalic S, Briganti S, Picardo M, Ricelli A, Fabbri AA** (2005) Relationship among lipoperoxides, jasmonates and indole-3-acetic acid formation in potato tuber after wounding. *Free Radical Research* **39**: 637-647
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**: 707-720
- Richert-Poggeler KR, Noreen F, Schwarzacher T, Harper G, Hohn T** (2003) Induction of infectious *Petunia* vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in *Petunia*. *The EMBO Journal* **22**: 4836-4845
- Rijkema A, Gerats T, Vandenbussche M** (2006) Genetics of floral development in *Petunia*. In Soltis D, Leebens-Mack J, Soltis P, Callow J, eds, *Advances in Botanical Research*, Vol 44. Academic Press, pp 237-278
- Riov J, Yang SF** (1982) Autoinhibition of ethylene production in citrus peel discs. *Plant Physiology* **69**: 687-690
- Riov J, Yang SF** (1989) Ethylene and auxin-ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation* **8**: 131-141
- Robbins J, Reid M, Paul J, Rost T** (1985) The effect of ethylene on adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation* **4**: 147-157
- Robbins JA, Kays SJ, Dirr MA** (1983) Enhanced rooting of wounded mung bean cuttings by wounding and ethephon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**: 325-329
- Rocha-Granados CM, Sanchez-Hernandez C, Martinez-Gallardo NA, Ochoa-Alejo N, Delano-Frier JP** (2005) The expression of the hydroxyproline-rich glycopeptide systemin precursor A in response to (a)biotic stress and elicitors is indicative of its role in the regulation of the wound response in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta* **222**: 794-810
- Rodriguez-Saona C, Crafts-Brandner SJ, Pare PW, Henneberry TJ** (2001) Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. *Journal of Chemical Ecology* **27**: 679-695
- Roitsch T** (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 198-206
- Royo E, León J, Sánchez-Serrano JJ** (1999) Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **20**: 135-142
- Roux C, Perrot-Rechenmann C** (1997) Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA *Nt-gh3*, related to GH3. *FEBS Letters* **419**: 131-136
- Royo J, Vancanneyt G, Perez AG, Sanz C, Störmann K, Rosahl S, Sanchez-Serrano JJ** (1996) Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 21012-21019
- Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorska R, Beeckman T, Friml J, Benkova E** (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell* **19**: 2197-2212
- Ryan CA** (2000) The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1477**: 112-121
- Sambrook J, Russell DW** (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Saniewski M, Czapski J** (1990) The effect of aminooxyacetic acid on ethylene production induced by methyl jasmonate in tomatoes. *Biologia Plantarum* **32**: 218-222
- Saniewski M, Miszczak A, Kawa-Miszczak L, Wegrzynowicz-Lesiak E, Miyamoto K, Ueda J** (1998) Effects of methyl jasmonate on anthocyanin accumulation, ethylene production, and CO₂ evolution in uncooled and cooled tulip bulbs. *Journal of Plant Growth Regulation* **17**: 33-37

- Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Ohta H, Tabata S** (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Research* **8**: 153-161
- Schaller A, Stintzi A** (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**: 1532-1538
- Schaller F, Zerbe P, Reinbothe S, Reinbothe C, Hofmann E, Pollmann S** (2008) The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* localization and cyclization. *The FEBS Journal* **275**: 2428-2441
- Scheer JM, Pearce G, Ryan CA** (2003) Generation of systemin signaling in tobacco by transformation with the tomato *systemin receptor kinase* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10114-10117
- Scheer JM, Ryan CA** (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9585-9590
- Schillmiller AL, Howe GA** (2005) Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 369-377
- Schillmiller AL, Koo AJK, Howe GA** (2007) Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiology* **143**: 812-824
- Schneider C, Pratt DA, Porter NA, Brash AR** (2007) Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chemistry & Biology* **14**: 473-488
- Schneider K, Kienow L, Schmelzer E, Colby T, Bartsch M, Miersch O, Wasternack C, Kombrink E, Stuible H-P** (2005) A new type of peroxisomal acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis thaliana* has the catalytic capacity to activate biosynthetic precursors of jasmonic acid. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 13962-13972
- Sembdner G, Parthier B** (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 569-589
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Choi YD** (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4788-4793
- Sharan M, Taguchi G, Gonda K, Jouke T, Shimosaka M, Hayashida N, Okazaki M** (1998) Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science* **132**: 13-19
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F-F, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N** (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**: 400-405
- Shibaoka H** (1971) Effects of indoleacetic, p-chlorophenoxyisobutyric and 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acids on three phases of rooting in *Azukia* cuttings. *Plant und Cell Physiology* **12**: 193-200
- Shibuya K, Barry KG, Ciardi JA, Loucas HM, Underwood BA, Nourizadeh S, Ecker JR, Klee HJ, Clark DG** (2004) The Central Role of PhEIN2 in Ethylene Responses throughout Plant Development in *Petunia*. *In*, Vol 136, pp 2900-2912
- Shoji T, Nakajima K, Hashimoto T** (2000) Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **41**: 1072-1076
- Sislert EC, Shang FY** (1984) Anti-ethylene effects of *cis*-2-butene and cyclic olefins. *Phytochemistry* **23**: 2765-2768
- Skrzypek E, Miyamoto K, Saniewski M, Ueda J** (2005) Jasmonates are essential factors inducing gummosis in tulips: Mode of action of jasmonates focusing on sugar metabolism. *Journal of Plant Physiology* **162**: 495-505
- Smalle J, Straeten D** (1997) Ethylene and vegetative development. *Physiologia Plantarum* **100**: 593-605

- Smeekens S** (1998) Sugar regulation of gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 230-234
- Smeekens S** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 49-81
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG, Klee HJ** (2005) The *decreased apical dominance1/Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *The Plant Cell* **17**: 746-759
- Stasinopoulos TC, Hangarter RP** (1990) Preventing photochemistry in culture media by long-pass light filters alters growth of cultured tissues. *Plant Physiology* **93**: 1365-1369
- Staswick PE, Su W, Howell SH** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 6837-6840
- Staswick PE, Tiryaki I** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 2117-2127
- Staswick PE, Tiryaki I, Rowe ML** (2002) Jasmonate response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell* **14**: 1405-1415
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB, Semir J** (2009) The genus *Petunia*. In Gerats T, Strommer J, eds, *Petunia*. Springer, New York, pp 1-28
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan C, Wasternack C** (2003a) Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signaling. *The Plant Journal* **33**: 577-589
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C** (2003b) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **51**: 895-911
- Stepanova AN, Hoyt JM, Hamilton AA, Alonso JM** (2005) A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**: 2230
- Stepanova AN, Yun J, Likhacheva AV, Alonso JM** (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* **19**: 2169-2185
- Stintzi A, Browse J** (2000) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10625-10630
- Strassner J, Schaller F, Frick U, Howe G, Weiler E, Amrhein N, Macheroux P, Schaller A** (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductase reveals differential roles for ocatdecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *The Plant Journal* **32**: 585-601
- Stuurman J, Hoballah ME, Broger L, Moore J, Basten C, Kuhlemeier C** (2004) Dissection of floral pollination syndromes in *Petunia*. *Genetics* **168**: 1585-1599
- Stuurman J, Jäggi F, Kuhlemeier C** (2002) Shoot meristem maintenance is controlled by a *GRAS*-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes & Development* **16**: 2213 - 2218
- Stuurman J, Kuhlemeier C** (2005) Stable two-element control of dTph1 transposition in mutator strains of *Petunia* by an inactive ACT1 introgression from a wild species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **41**: 945-955
- Sun J, Chen Q, Qi L, Jiang H, Li S, Xu Y, Liu F, Zhou W, Pan J, Li X, Palme K, Li C** (2011) Jasmonate modulates endocytosis and plasma membrane accumulation of the *Arabidopsis* PIN2 protein. *New Phytologist* **191**: 360-375

- Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, Chen Q, Liu F, Zhou W, Chen R, Li X, Tietz O, Wu X, Cohen JD, Palme K, Li C (2009) *Arabidopsis*ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *The Plant Cell* **21**: 1495-1511
- Swarup RC, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GTS, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *The Plant Cell* **19**: 2186-2196
- Swarup RC, Sujit R, Dibyendu NS (2008) Characterization of transcriptional profiles of *MA-ACS1* and *MA-ACO1* genes in response to ethylene, auxin, wounding, cold and different photoperiods during ripening in banana fruit. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1865-1878
- Swiatek A, Dongen WV, Esmans EL, Onckelen HV (2004) Metabolic fate of jasmonates in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* **135**: 161-172
- Takabayashi J, Dicke M (1996) Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science* **1**: 109-113
- Takahashi F, Sato-Nara K, Kobayashi K, Suzuki M, Suzuki H (2003) Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Research* **116**: 83-91
- Tang X, Gomes A, Bhatia A, Woodson WR (1994) Pistil-specific and ethylene-regulated expression of *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* genes in *Petunia* flowers. *The Plant Cell* **6**: 1227-1239
- Tang X, Wang H, Brandt AS, Woodson WR (1993) Organization and structure of the *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* gene family from *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology* **23**: 1151-1164
- Theodoulou FL, Job K, Slocombe SP, Footitt S, Holdsworth M, Baker A, Larson TR, Graham IA (2005) Jasmonic acid levels are reduced in *COMATOSE ATP-binding cassette transporter* mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiology* **137**: 835-840
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661-665
- Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Kruschke M, Steffan B, Roitsch T, Mueller MJ (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *The Plant Journal* **34**: 363-375
- Titapiwatanakun B, Murphy AS (2009) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: Cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1093-1107
- Toro FJ, Martín-Closas L, Pelacho AM (2003) Jasmonates promote cabbage (*Brassica oleracea* L. var *Capitata* L.) root and shoot development. *Plant and Soil* **255**: 77-83
- Truernit E, Schmid J, Epple P, Illig J, Sauer N (1996) The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis*STP4 gene: Enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *The Plant Cell* **8**: 2169-2182
- Tung P, Hooker TS, Tampe PA, Reid DM, Thorpe TA (1996) Jasmonic acid: Effects on growth and development of isolated tomato roots cultured *in vitro*. *International Journal of Plant Sciences* **157**: 713-721
- Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjärvi J (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **39**: 59-69
- Turlings TC, Loughrin JH, McCall PJ, Röse US, Lewis WJ, Tumlinson JH (1995) How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4169-4174
- Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* **14**: 153-164
- Ueda J, Kato J (1980) Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology* **66**: 246-249

- Van den Broeck D, Maes T, Sauer M, Zethof J, De Keukeleire P, D'Hauw M, Van Montagu M, Gerats T** (1998) Transposon display identifies individual transposable elements in high copy number lines. *The Plant Journal* **13**: 121-129
- van der Meer IM, Stam ME, van Tunen AJ, Mol JNM, Stuitje AR** (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in *Petunia* anthers results in male sterility. *The Plant Cell* **4**: 253-262
- Van Houwelingen A, Souer E, Spelt K, Kloos D, Mol J, Koes R** (1998) Analysis of flower pigmentation mutants generated by random transposon mutagenesis in *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* **13**: 39-50
- Vandenbussche M, Zethof J, Souer E, Koes R, Tornielli GB, Pezzotti M, Ferrario S, Angenent GC, Gerats T** (2003) Toward the analysis of the *Petunia* MADS box gene family by reverse and forward transposon insertion mutagenesis approaches: B, C, and D floral organ identity functions require *SEPALLATA-like MADS box* genes in *Petunia*. *The Plant Cell* **15**: 2680-2693
- Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, Kohchi T, Gheysen G** (2007) The Tify family previously known as ZIM. *Trends in Plant Science* **12**: 239-244
- Veierskov B, Hansen J, Andersen AS** (1976) Influence of cotyledon excision and sucrose on root formation in pea cuttings. *Physiologia Plantarum* **36**: 105-109
- Veierskov B, Skytt Andersen A, Eriksen EN** (1982) Dynamics of extractable carbohydrates in *Pisum sativum*. I. Carbohydrate and nitrogen content in pea plants and cuttings grown at two different irradiances. *Physiologia Plantarum* **55**: 167-173
- Verdonk JC, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink RC** (2003) Regulation of floral scent production in *Petunia* revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry* **62**: 997-1008
- Vick BA, Zimmerman DC** (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* **75**: 458-461
- Visser EJW, Cohen JD, Barendse GWM, Blom C, Voeselek L** (1996) An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiology* **112**: 1687-1692
- Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chételat A, Farmer EE** (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* **24**: 467-476
- Walling LL** (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 195-216
- Wang C, Avdiushko S, Hildebrand D** (1999) Overexpression of a cytoplasm-localized allene oxide synthase promotes the wound-induced accumulation of jasmonic acid in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* **40**: 783-793
- Wang K-C, Li H, Ecker J** (2002a) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell Suppl.*: S131-S151
- Wang L, Allmann S, Wu J, Baldwin IT** (2008) Comparisons of *LIPOXYGENASE3-* and *JASMONATE-RESISTANT4/6-*silenced plants reveal that jasmonic acid and jasmonic acid-amino acid conjugates play different roles in herbivore resistance of *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **146**: 904-915
- Wang S, Ichii M, Taketa S, Xu L, Xia Kai, Zhou Xie** (2002b) Lateral root formation in rice (*Oryza sativa*): Promotion effect of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **159**: 827-832
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **100**: 681-697
- Wasternack C, Hause B** (2002) Jasmonates and octadecanoids - Signals in plant stress response and development. In Moldave K, ed, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 72. Academic Press, New York, pp 165-221
- Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O** (2006) The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **163**: 297-306

- Weber H, Chételat A, Caldelari D, Farmer EE** (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *The Plant Cell* **11**: 485-494
- Weber H, Vick BA, Farmer EE** (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate-family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 10473-10478
- White J, Lovell PH** (1984) The anatomy of root initiation in cuttings of *Griselinia littoralis* and *Griselinia lucida*. *Annals of Botany* **54**: 7-20
- Wijsman HJW** (1982) On the interrelationships of certain species of *Petunia*. I. Taxonomic notes on the parental species of *Petunia hybrida*. *Acta Botanica Neerlandica* **31**: 477-490
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Clark DG, Bleecker AB, Chang C, Meyerowitz EM, Klee HJ** (1997) A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nature biotechnology* **15**: 444-447
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen H-C, Giovannoni JJ, Klee HJ** (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* **270**: 1807-1809
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N** (2000) Sugar transporters in higher plants - A diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* **5**: 283-290
- Woodson WR, Park KY, Drory A, Larsen PB, Wang H** (1992) Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiology* **99**: 526-532
- Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**: 707-735
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG** (1998) COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094
- Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D** (2002) The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 1919-1935
- Xu Y, Chang P-FL, Liu D, Narasimhan M, Raghothama K, Hasegawa P, Bressan R** (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *The Plant Cell* **6**: 1077-1085
- Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S** (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *The Plant Cell* **17**: 1953-1966
- Yamane H, Takagi H, Abe H, Yokota T, Takahashi N** (1981) Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant and Cell Physiology* **22**: 689-697
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F, Wang Z, Xie D** (2009) The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant Cell* **21**: 2220-2236
- Yan Y, Stolz S, Chételat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE** (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell* **19**: 2470-2483
- Yoshihara T, Omer EA, Koshino H, Sakamura S, Kikuta Y, Koda Y** (1989) Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* **53**: 2835-2837
- Yu YB, Adams DO, Yang SF** (1979) 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **198**: 280-286
- Zdyb A, Demchenko K, Heumann J, Mrosk C, Grzegarek P, Göbel C, Feussner I, Pawlowski K, Hause B** (2011) Jasmonate biosynthesis in legume and actinorhizal nodules. *New Phytologist* **189**: 568-579
- Zhang L, Cohn NS, Mitchell JP** (1996) Induction of a *pea cell-wall invertase* gene by wounding and its localized expression in phloem. *Plant Physiology* **112**: 1111-1117
- Ziegler J, Hamberg M, Miersch O, Parthier B** (1997) Purification and characterization of allene oxide cyclase from dry corn seeds. *Plant Physiology* **114**: 565-573

- Ziegler J, Keinänen M, Baldwin IT** (2001) Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry* **58**: 729-738
- Ziegler J, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Hamberg M, Grimm R, Ganai M, Wasternack C** (2000) Molecular cloning of allene oxide cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 19132-19138
- Ziegler J, Wasternack C, Hamberg M** (1999) On the specificity of allene oxide cyclase. *Lipids* **34**: 1005-1015
- Zimmerman PW, Hitchcock AE** (1933) Initiation and stimulation of adventitious roots caused by unsaturated hydrocarbon gases. *Contributions to the Boyce Thompson Institute* **5**: 351-359
- Zimmerman PW, Wilcoxon F** (1935) Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. *Contributions to the Boyce Thompson Institute* **7**: 209-229
- Zolman BK, Silva ID, Bartel B** (2001) The *Arabidopsis pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Plant Physiology* **127**: 1266-1278
- Zolman BK, Yoder A, Bartel B** (2000) Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* **156**: 1323-1337

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und all denen ganz herzlich danken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit tatkräftig unterstützt haben und somit zum Gelingen der selbigen beitrugen.

Vielen lieben Dank

... an PD Dr. Bettina Hause, die die vorliegende Arbeit betreute. Vielen Dank für die Bereitstellung des Themas, für die Offenheit gegenüber Fragen und Problemen, für die interessanten Diskussionen, für die Freiheit eigene Ideen umsetzen zu können, für die Möglichkeit an verschiedenen Fachtagungen und Kongressen teilzunehmen und schlussendlich für die große Geduld während der letzten Monate, in denen ich an den Schreibtisch verbannt war.

... an Dr. Carolin Delker für die fachliche aber auch menschliche Unterstützung. Danke für das immerwährende Interesse am Fortgang dieser Arbeit, für die vielen Ideen, die interessanten Diskussionen, die netten und motivierenden Worte, für das kritische Lesen der Arbeit und nicht zu vergessen für die Englisch-Nachhilfe.

... an Prof. Dr. Ronald Koes und Dr. Francesca Quattrocchio für die Möglichkeit, das Screening der *dTph1*-Insertionsmutanten-Population an der Universität Amsterdam durchzuführen. Danke für die Einarbeitung in die Methode, für die Nutzung der Räumlichkeiten und des Materials sowie für die schöne Zeit in Amsterdam.

... an Dr. Otto Miersch und Birgit Ortel für die GC-MS-Analyse sowie Christian Böttcher und Dr. Robert Kramell für die Einarbeitung und Hilfe bei der Bestimmung der enzymatischen PhAOC-Aktivität.

... an Dr. Jürgen Schmidt für die massenspektrometrischen Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit leider nicht aufgeführt sind.

... an Dr. Susanne Schulz für die Einarbeitung in die Biostatistik, die interessanten Diskussionen, die vielen motivierenden Worte sowie für das kritische Lesen der Arbeit.

... an Dr. Sigfried Zerche für die Analyse der Bodenproben und die daraus resultierende Empfehlung zur Düngung der Pflanzen.

... an alle jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Jasmonatfunktion & Mykorrhiza sowie denen der Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

... an Anne Muchow und Daniela Kleen sowie an alle Studenten und Praktikanten, die mich mit ihrer Arbeit unterstützt haben.

... an alle Mitarbeiter der Administration. Mein besonderer Dank gilt dabei Kerstin Balkenhohl, Holger Bartz, Annett Kohlberg, Andrea Piskol, Petra Jansen und Martina Allstedt.

... meinen Freunden und all jene, die mich besonders in der letzten Phase meiner Doktorarbeit durch Korrekturlesen, nette Gespräche, aufmunternde Worte, den ein oder anderen Kaffee oder einfach durch ihre Anwesenheit im richtigen Moment unterstützt haben.

DANKE! DANKE! DANKE!

Die Arbeit wurde durch die Leibniz-Gemeinschaft im Rahmen des Pakts für Innovation und Forschung („Molekulare und physiologische Untersuchung der Entwicklung von Adventivwurzeln“) gefördert und teilweise vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale finanziert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sandra Lischewski
Geb.: 28.08.1974 in Lutherstadt Eisleben
Familienstand: ledig

Werdegang

09/1981 – 08/1991 Mittlere Reife an der Polytechnischen Oberschule, Eisleben

09/1991 – 08/1994 Ausbildung zur Krankenschwester an der Berufsbildenden Schulen für Gesundheit, Körperpflege und Sozialpädagogik, Halle/Saale

31.08.1994 Abschluss: Staatlich geprüfte Krankenschwester

09/1994 – 08/2001 Tätigkeit als Krankenschwester in verschiedenen klinischen Bereichen

09/1998 – 12/2000 Fachhochschulreife an der Schule des zweiten Bildungsweges (Abendgymnasium), Halle/Saale

10/2001 – 02/2006 Studium an der Hochschule Anhalt (FH), Köthen
Abschluss: Diplomingenieur für Biotechnologie (FH)

02/2006 – 06/2010 Promotionsstelle in der Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale

Seit 09/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität, Halle/Saale

Halle/Saale, Juli 2011

Publikationen

Ahkami AH, Lischewski S, Haensch K-T, Porfirova S, Hofmann J, Rolletschek H, Melzer M, Franken P, Hause B, Druège U, Hajirezaei MR (2009) Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist* **181**: 613-625

Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M (2010) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology* **10**: 4

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertationsschrift erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den