

**Identifizierung und Charakterisierung
der *tumor prone* Mutanten
von *Arabidopsis thaliana*
und *Atckx*-Mutanten**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

Michael August Riefler

aus Tübingen

2002

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.01

Dekan: Prof. Dr. Hans-Ulrich Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Fritz Schöffl

Widmung

**Für Sabine,
Melisande und Samson,
die ihr wie Sonnenstrahlen mein Leben erwärmt und erhellt.**

Never give up, never surrender.

Commander Peter Q. Taggart
des Raumschiffs NSEA Protector
in *Galaxy Quest*

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Schmülling für die hervorragende Betreuung der Arbeit und für die Überlassung des Themas. Die offene und anregende Arbeitsatmosphäre, die vielen Diskussionen und die stets optimistische Betrachtungsweise hatten großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Fritz Schöffl möchte ich für die Übernahme der Zweitkorrektur danken und außerdem für die Diskussionen in vielen Montags- und Donnerstagsseminaren. Die Grillfeste waren immer ein Höhepunkt des Sommers, der mir in guter Erinnerung bleiben wird.

Besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der AG Schmülling die stets offen und hilfsbereit war und bei der wirklich ein tolles Arbeitsklima und auch viel Initiative zu Feiern herrschte. Auch allen Gastwissenschaftlern möchte ich für die fachliche Bereicherung und die „globale Dorfatmosphäre“ danken.

Ich möchte mich bei den zahlreichen studentischen Hilfskräften, allen voran Dirk Hoffmann bedanken, die mich in meinen aufwändigen Screeningarbeiten unterstützt haben und die mit mir tapfer auf Mutantenjagd gingen.

Herzlichen Dank an Charlotte Rehm, die uns nicht nur in allen administrativen Schlachten tatkräftig zur Seite stand, sondern die auch die Seele des achten Stocks ist.

Den Gärtnerinnen und Gärtnern mit dem grünen Daumen sei für die Pflege der Pflanzen und die Beschriftung tausender von Samentüten gedankt.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des achten Stocks bedanken für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die stets offenen Türen.

Sabine möchte ich für die Hilfe bei den Korrekturen danken und die unermüdliche Energie mit der sie mich unterstützt hat.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern danken, die mit großem Interesse und Vertrauen in meine Fähigkeiten mein Studium begleitet haben. Ihre finanzielle Unterstützung hat mit das Studium wesentlich erleichtert.

Außerdem möchte ich mich bei allen bedanken, die mit aufrichtigem Interesse den Fortschritt der Arbeit verfolgt und begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumorbildung in Pflanzen.....	1
1.2	An Teilung und Differenzierung beteiligte Phytohormone.....	4
1.2.1	Cytokinine.....	4
1.2.1.1	Wirkung der Cytokinine.....	4
1.2.1.2	Biochemie, Synthese und Katabolismus der Cytokinine.....	4
1.2.1.3	Transgene Pflanzen.....	5
1.2.1.4	Mutanten mit verändertem Cytokiningehalt oder veränderter Cytokininantwort.....	5
1.2.2	Auxine.....	8
1.2.2.1	Wirkung der Auxine.....	8
1.2.2.2	Biochemie, Synthese und Katabolismus.....	8
1.2.2.3	Transport der Auxine.....	9
1.2.2.4	Mutanten mit veränderter Auxinsensitivität.....	9
1.2.2.5	Frühe Gene der Auxinantwort.....	10
1.2.3	Wechselwirkung von Cytokinin und Auxin.....	11
1.3	Kontrolle von Zellteilung und -differenzierung.....	11
1.3.1	Zellteilungskontrolle durch Cytokinine.....	12
1.3.2	Zellteilungskontrolle durch Auxine.....	13
1.3.3	Weitere Zellzykluskontrollfaktoren.....	13
1.4	Ziele der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Pflanzliches Material.....	16
2.1.1	Ökotypen.....	16
2.1.2	Mutantenlinien.....	16
2.1.3	Pflanzenanzucht auf Erde.....	17
2.1.3.1	Kultivierungsbedingungen in der Klimakammer.....	17
2.1.3.2	Kreuzungen.....	17
2.1.3.3	Schädlingsbekämpfung.....	18
2.1.4	Pflanzenkultur <i>in vitro</i>	18
2.1.4.1	Oberflächensterilisierung der Samen.....	18
2.1.4.2	MS-Medium.....	19
2.1.4.3	KS-Medium.....	19
2.1.4.4	Kallusscreening.....	19
2.1.4.5	Induktion von Arabidopsis-Kalli.....	19
2.1.4.6	Dunkelkeimung.....	20
2.2	Histologische Methoden.....	20
2.2.1	Fixierung von Pflanzengewebe.....	20
2.2.2	DAPI-Färbung von Wurzelspitzen.....	20
2.2.3	Messung des Wurzelmeristems.....	20
2.2.4	Histochemische GUS-Analysen.....	21
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	21
2.3.1	DNA-Isolierung.....	21
2.3.1.1	Isolierung genomischer DNA für die Southern blot-Analyse.....	21
2.3.1.2	Isolierung von genomischer DNA für die Kartierung.....	22
2.3.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	22
2.3.2	PCR.....	22
2.3.2.1	Standardansatz.....	22
2.3.2.2	PCR-Reaktion für die Amplifikation von SSLP-Markern.....	23
2.3.3	DNA-Sequenzanalyse.....	24
2.3.3.1	DNA-Sequenzierung.....	24
2.3.3.2	Computeranalyse von DNA-Sequenzen.....	24
2.3.4	Southern Blot und Hybridisierung mit DNA-Sonden.....	24
2.3.4.1	DNA-Transfer auf Nylonmembranen.....	24
2.3.4.2	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	25
2.3.4.3	Hybridisierungen von Filtern.....	25
2.4	Optische Geräte.....	25

2.5	Stammlösungen und Chemikalien	25
2.6	Primer	27
2.6.1	Primer für Screening nach Insertionsmutanten.....	27
2.6.2	Primer für Mapping.....	30
2.6.3	Primer zur Bestätigung der Insertionen in den <i>Atckx</i> -Linien.....	30
2.7	Genproben.....	30
2.8	Abkürzungen.....	31
2.8.1	Abkürzungen für Cytokinine.....	32
2.8.2	Abkürzungen für Auxine	33
3	Ergebnisse.....	33
Ergebnisteil A.....		33
3.1	Vorversuche.....	33
3.1.1	Initiierung von Wundkallus an WT Pflanzen.....	33
3.1.2	Hormonmatrix.....	35
3.1.3	Versuche mit bekannten Mutanten	37
3.2	Beschreibung des Screens.....	39
3.2.1	Details des Screens	39
3.2.2	Klassifizierung der Mutantenlinien	40
3.3	Genetische Charakterisierung der <i>tup</i> Mutanten.....	41
3.3.1	Segregationsanalyse.....	41
3.3.2	Komplementationsanalyse.....	41
3.3.3	Grobkartierung der <i>tup</i> Loci.....	42
3.4	Phänotypische Beschreibung der <i>tup</i> Mutanten.....	46
3.4.1	Phänotypische Beschreibung der <i>tup1</i> Mutante.....	46
3.4.1.1	Kallusbildung <i>in vitro</i>	46
3.4.1.2	Pflanzenphänotyp von <i>tup1</i>	47
3.4.1.3	Wurzelentwicklung von <i>tup1</i>	48
3.4.1.4	Blattentwicklung von <i>tup1</i>	51
3.4.1.5	Blüte und Schotenentwicklung von <i>tup1</i>	51
3.4.2	Phänotypische Beschreibung der <i>tup2</i> Mutante.....	52
3.4.2.1	Kallusbildung <i>in vitro</i> von <i>tup2</i>	52
3.4.2.2	Pflanzenphänotyp von <i>tup2</i> auf Erde.....	54
3.4.2.3	Wurzelentwicklung von <i>tup2</i>	54
3.4.2.4	Blattentwicklung von <i>tup2</i>	55
3.4.2.5	Blüte und Schotenentwicklung von <i>tup2</i>	56
3.4.2.6	Vergleich mit der Cytokinin überproduzierenden Mutante <i>amp1</i>	57
3.4.3	Phänotypische Beschreibung der <i>tup3</i> Mutante.....	57
3.4.3.1	Kallusbildung <i>in vitro</i> von <i>tup3</i>	57
3.4.3.2	Kallusbildung an <i>tup3</i> Mutanten <i>in vitro</i>	58
3.4.3.3	Pflanzenphänotyp von <i>tup3</i> auf Erde.....	58
3.4.3.4	Wurzelentwicklung von <i>tup3</i>	59
3.4.3.5	Blattentwicklung von <i>tup3</i>	61
3.4.3.6	Blüten- und Schotenentwicklung von <i>tup3</i>	62
3.4.4	Phänotypische Beschreibung der <i>tup4</i> Mutante.....	63
3.4.4.1	Kallusbildung von <i>tup4 in vitro</i>	63
3.4.4.2	Phänotyp von <i>tup4</i> Pflanzen 63	
3.4.4.3	Blattentwicklung von <i>tup4</i>	64
3.4.4.4	Blüte und Schotenentwicklung von <i>tup4</i>	64
3.4.5	Phänotypische Beschreibung der <i>tup5</i> Mutante.....	65
3.4.5.1	Kallusbildung von <i>tup5 in vitro</i>	65
3.4.5.2	Pflanzenphänotyp von <i>tup5</i>	66
3.5	Vergleichende Analyse von Wachstumsparametern der <i>tup</i> Mutanten.....	68
3.5.1	Wachstumscharakteristika der Wurzeln	68
3.5.1.1	Wurzellängenwachstum	68
3.5.1.2	Wurzellänge bei Wachstum im Dunkeln.....	69
3.5.1.3	Größe des Wurzelmeristems	70
3.5.1.4	Lateral- und Adventivwurzeln	72
3.5.2	Blattzahl	73

3.5.3	Blühzeitpunkte.....	74
3.5.4	Hypokotyllänge bei Dunkelkeimung.....	74
3.6	Wirkung exogener Hormone auf <i>tup</i> Kalli und <i>tup</i> Keimlinge.....	75
3.6.1	Einfluß von 2iP auf die Gewichtszunahme von <i>tup</i> Kalli.....	75
3.6.2	Einfluß exogener Hormone auf das Differenzierungsverhalten von <i>tup</i> Kalli.....	77
3.6.3	Einfluß exogener Hormone auf <i>tup</i> Keimlinge.....	79
3.7	Expression von Markergenen.....	80
3.7.1	Expression eines <i>early response</i> Gens der Cytokinine (<i>ARR5</i>) in <i>tup1</i>	80
3.7.2	Expression von <i>DR5::GUS</i> in <i>tup1</i>	81
3.7.3	<i>KNAT1</i> -Expression in <i>tup1</i> Pflanzen und Kalli.....	82
3.7.4	<i>CycB1</i> -Expression in <i>tup1</i> Pflanzen und Kalli.....	83
3.7.5	Expression eines <i>early response</i> Gens für Cytokinine (<i>ARR5</i>) in <i>tup2</i>	83
3.7.6	Expression eines <i>early response</i> Gens für Cytokinine (<i>ARR5</i>) in <i>tup3</i>	83
3.8	Phänotypische und genetische Charakterisierung der <i>asm</i> Mutanten.....	85
3.8.1	Beschreibung des <i>asm</i> Phänotyps.....	85
3.8.1.1	Phänotypische Beschreibung der <i>asm1</i> Mutante.....	85
3.8.1.2	Phänotypische Beschreibung der <i>asm2</i> Mutante.....	85
3.8.1.3	Phänotypische Beschreibung der <i>asm3</i> Mutante.....	86
3.8.1.4	Phänotypische Beschreibung der <i>asm4</i> Mutante.....	86
3.8.2	Komplementationsanalyse der <i>asm1</i> Mutante.....	87
4	Ergebnisteil B.....	88
4.1	Insertionsmutanten von <i>AtCKX</i> Genen.....	88
4.1.1	Transposon-Linien.....	89
4.1.1.1	Primerdesign und Screening nach <i>En1</i> -Insertionsmutanten.....	89
4.1.2	T-DNA-Insertionsmutanten.....	94
4.1.2.1	<i>Knock-out</i> -Linien der Wisconsin-Kollektion.....	94
4.1.2.1.1	First und Second Round Screen.....	94
4.1.2.1.2	Auffinden der Einzellinie.....	96
4.1.2.1.3	Zusammenstellung der gefundenen Insertionslinien.....	96
4.1.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>Knock-out</i> -Linien <i>Atckx2</i> , <i>Atckx3</i> , <i>Atckx4</i> und <i>Atckx5</i>	98
5	Diskussion.....	101
5.1	Etablierung des Kallusscreens.....	102
5.2	<i>tup</i> Mutanten.....	103
5.2.1	Die <i>tup1</i> Mutante.....	103
5.2.1.1	Der Phänotyp der <i>tup1</i> Mutante.....	103
5.2.1.2	Der Genotyp der <i>tup1</i> Mutante.....	106
5.2.2	Die <i>tup2</i> Mutante.....	106
5.2.2.1	Der Phänotyp der <i>tup2</i> Mutante.....	106
5.2.2.2	Der Genotyp der <i>tup2</i> Mutante.....	108
5.2.3	Die <i>tup3</i> Mutante.....	109
5.2.3.1	Der Phänotyp der <i>tup3</i> Mutante.....	109
5.2.3.2	Der Genotyp der <i>tup3</i> Mutante.....	111
5.2.4	Charakterisierung der <i>tup4</i> und <i>tup5</i> Mutanten.....	111
5.2.4.1	Die <i>tup4</i> Mutante.....	112
5.2.4.2	Die <i>tup5</i> Mutante.....	112
5.3	Ausblick.....	113
5.4	<i>Atckx</i> Insertionsmutanten.....	113
5.4.1	Isolierung der <i>Atckx</i> Insertionsmutanten.....	113
5.4.2	Vorversuche zur phänotypischen Charakterisierung der <i>Atckx2</i> , <i>Atckx4</i> und <i>Atckx5</i> <i>Knock-out</i> Mutanten.....	116
5.5	Ausblick.....	117
6	Zusammenfassung.....	118
7	Literatur.....	121

1 Einleitung

Bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen gibt es zwischen Pflanzen und Tieren grundlegende Unterschiede. Bei Tieren sind im Adultstadium Wachstums- und Entwicklungsvorgänge fast vollständig abgeschlossen und durch Zellteilung werden vornehmlich abgestorbene Zellen ersetzt. Zudem wird die Identität von Zellen insbesondere dadurch bestimmt, aus welcher Zelllinie sie sich entwickelt haben. Im Gegensatz dazu bleiben bei Pflanzen Wachstum und Morphogenese während der gesamten Pflanzenentwicklung erhalten. Da Zellteilung fast ausschließlich auf Meristeme beschränkt ist, wird die Identität einer Pflanzenzelle meist durch ihre relative Position zu anderen Zellen bestimmt, d.h. Wachstum und Differenzierung einzelner Zellen wird z.T. von den benachbarten Zellen kontrolliert (Sussex 1989, Meyerowitz 1997). Die Begrenzung von Zellteilung auf wenige Bereiche und die Etablierung rigider Zellwände sind wichtige Gründe, weshalb Tumorbildung in Pflanzen wesentlich seltener anzutreffen ist als im tierischen Organismus. Dennoch gibt es unterschiedliche Faktoren, durch die Tumore in Pflanzen entstehen können. Bei einem Großteil der bei Pflanzen vorkommenden Tumore steht die Tumorbildung in Zusammenhang mit Veränderungen des Cytokinin/Auxinverhältnisses oder der Sensitivität gegenüber einem der beiden Hormone (Akiyoshi et al. 1984, Boerjan et al. 1995, Campell und Town 1991, Frank 1999, Morris 1995, Pennazio und Roggero 1998). Nach einer Einführung in das Phänomen der Tumorbildung bei Pflanzen wird deshalb ein Überblick über die zwei Phytohormonklassen der Cytokinine und Auxine folgen. Des Weiteren werden der Zellzyklus bei Pflanzen und daran beteiligte Kontrollgene vorgestellt. Insbesondere wird auf die Regulation des Zellzyklus durch Cytokinine und Auxine an den spezifischen Kontrollpunkten der Zellteilung eingegangen.

1.1 Tumorbildung in Pflanzen

Es gibt sehr unterschiedliche Ursachen, die zu einer Tumorbildung in Pflanzen führen können, wobei die Mechanismen der Tumorbildung nur zum Teil bekannt sind. Bestimmte parasitierende Bakterien und Viren können Gallen an Pflanzen induzieren (Akiyoshi et al. 1984, Morris 1995). Neben biologischen Faktoren kann auch durch γ -Strahlung Tumorbildung an Pflanzen ausgelöst werden (Campell und Town, 1991). Genetische Tumore wurden an Hybriden bestimmter Pflanzenarten beobachtet (Meins und Foster 1986). Des Weiteren können hormoninduzierte Kalli spontan oder graduell die Fähigkeit erlangen, hormonunabhängig weiterzuwachsen. Dies wird als Habituation bezeichnet (Meins und Hansen 1992). Auch Mutationen in einzelnen Genen verursachen Tumorbildung, sowie

Überexpression von zellzyklusspezifischen oder meristematischen Genen in transgenen Pflanzen (Dockx et al. 1996, Frank 1999, Riou-Khamlichi et al. 1999, Rupp 1997).

Das wohl bekannteste Beispiel für Tumorbildung bei Pflanzen sind die Wurzelhalsgallen, die durch *Agrobacterium tumefaciens* ausgelöst werden. Dabei schleust das Bakterium eine Transfer-DNA (T-DNA) in das Genom des Pflanzenwirts ein, auf der sich sowohl die Isopentenyltransferase (*ipt*), als Synthesegen für Cytokinin, sowie die zwei Auxinsynthesegene Tryptophan-Monooxygenase (*aux1* oder *iaaM*) und Indolacetamid-Hydrolase (*aux2* oder *iaaH*) befinden (Akiyoshi et al. 1984, Morris 1995). Durch Überexpression dieser Gene in Tabak konnten in Pflanzen Tumore induziert werden (Binns et al. 1987, Beinsberger et al. 1991). Neben den Synthesegenen wurde auch noch das Onkogen *6b* isoliert. Es kann Tumorbildung auslösen, wenn es durch *A. tumefaciens* in verschiedene Wirtspflanzen transferiert wird (Hooykaas et al. 1988). In Zusammenhang mit der Tumorbildung durch das Onkogen *6b* konnte gezeigt werden, dass sich das Verhältnis von Cytokinin und Auxin verändert hat (Hooykaas et al. 1988). Hamill et al. (1993) wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Auxin nach. Auch durch die Überexpression des *rolB* Gens, welches auf der T-DNA von *Agrobacterium rhizogenes* liegt, wurde eine erhöhte Auxinsensitivität und ektopische Wurzelbildung beobachtet (Cardarelli et al. 1987, Maurel et al. 1991, Schmülling et al. 1993).

Die bisher bekannten Wundtumoviren (WTV), die fast alle zur Familie der *Reoviridae* gehören, werden in der Natur durch Verwundung der Pflanzen durch Insekten übertragen (Gaspar, 1999). An infizierten Reispflanzen kommt es zur Gallenbildung, *Trifolium* bildet nach Infektion Tumore an den Lateralwurzeln aus (Omura et al. 1982, Brunt et al. 1997). In infizierten Pflanzen kann es, je nach Virusstamm, zu einer Erhöhung oder Verringerung der Cytokininkonzentration kommen, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen bisher noch nicht verstanden sind (Pennazio und Roggero 1998).

Durch γ -Strahlen gelang es Persinger und Town (1991) an *Arabidopsis* Pflanzen Tumore zu induzieren, die hormonunabhängig weiterwuchsen und spontan Sprosse oder Wurzeln ausbildeten. Bei Vertretern der Tumortalien konnten sie veränderte Cytokinin/Auxinverhältnisse nachweisen, die jedoch nicht mit den entstandenen Phänotypen korrelierbar waren. Campell und Town (1991) vermuteten, dass *downstream* Elemente der Cytokinin- bzw. Auxinsignaltransduktion betroffen waren, konnten aber von der Signaltransduktion unabhängige Gene nicht ausschliessen.

Hormonunabhängiges Wachstum von Geweben in Zellkulturen wurde erstmals von Gautheret (1942) an Karotten beobachtet. Diese Habitation, die vor allem Cytokinine (und in geringerem Ausmass Vitamine) betrifft, kann spontan oder graduell entstehen (Meins 1989). In *Nicotiana tabacum* zeigten *HI-1* und *HI-2* Mutanten in Kultur Kallusbildung auf

cytokininfreiem Medium (Meins und Foster, 1986). Durch die Mutation wurde der Pflanzenphänotyp nicht verändert, aber Pflanzen die das *Hl-1* Allel trugen, bildeten im Gegensatz zu WT Pflanzen, Tumore nach Transformation mit den auxinsynthetisierenden Genen von *Agrobacterium tumefaciens* (Meins und Hansen, 1992). Sachs (1986, 1988) argumentierte, dass wahrscheinlich bestimmte Hormongradienten die Hormonproduktion in kompetenten Kalluszellen induzieren oder dass Zellen, die verringerte Anforderungen an Hormone haben, selektioniert werden und dies zur Bildung spezieller Kallusstrukturen führt. Die genetischen Grundlagen sind bisher noch nicht gut erforscht.

Eine herausragende Funktion der Auxine bei der Tumorbildung konnte anhand der *superroot1/rooty (sur1/rty)* Mutante aufgewiesen werden (Boerjan et al. 1995, Celenza et al. 1995, King et al. 1995, Lehman et al. 1996). *sur1/rty* entwickelt zwei Wochen nach Keimung am Wurzelhals einen schnell wachsenden wurzelbildenden Kallus. Innerhalb kurzer Zeit sind Hypokotyl und Kotyledonen überwuchert. In den *rty/sur1* Mutanten wurde eine zehn- bis sechzehnfache Erhöhung an freiem und konjugiertem IAA gemessen. Das *RTY* Gen wurde von Golparaj et al. (1996) kloniert, es zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Tyrosinaminotransferasen. Es wird vermutet, dass *RTY* eine zentrale Rolle in der Biosynthese des IAA spielt (Bartel 1997).

Die von Rupp (1997) und Frank (1999) gefundenen EMS-induzierten Mutanten zeigten aberrante, infertile Phänotypen, die auf hormonfreiem Medium Kalli ausbildeten. Rupp (1997) klassifizierte die Mutanten in die wurzelbildenden *rooty* Kalli, die sprossbildende *shooty* Kalli und die *callus* Klasse, die als undifferenziertes Kallusgewebe wuchsen. Da es aufgrund von Infertilität nicht gelang eine Genetik für die Kalli zu etablieren, screenete Frank (1999) Einzellinienmutanten, die auf hormonfreiem Medium Kalli ausbildeten. Er konnte 6 *trd (tumorous root development)* und 4 *tsd (tumorous shoot development)* Mutanten isolieren. Die *trd* Mutanten erwiesen sich alle als allelisch zu *sur/rty* (Boerjan et al. 1995, Celenza et al. 1995, King et al. 1995, Lehman et al. 1996). Bei hohen exogenen Cytokininkonzentrationen war die Gewichtszunahme der apikalen *tsd* Kalli bis um das fünffache im Vergleich zu WT Pflanzen erhöht. Diese Hypertrophie der Kalli war spezifisch für Cytokinine (Frank 1999). *cytokinin hypersensitive 1* und *2* Wurzelexplantate (*ckh1* und *ckh2*) zeigten auf niedrigen Cytokinin/Auxinkonzentrationen im Medium im Vergleich zu WT eine verstärkte Kallusbildung (Kubo und Kakimoto, 2000). Kubo und Kakimoto (2000) argumentieren, dass *CKH1* und *CKH2* als negative Regulatoren der Signaltransduktion zwischen Cytokininen und Zellteilung wirken. Ohne Hormone kam es jedoch nicht zur Kallusbildung.

Durch Überexpression von *CycD3* unter der Kontrolle eines 35S Promotors konnte an Blattexplantaten kallusartiges Gewebe induziert werden (Riou-Khamlichi et al. 1999). Auch durch eine Überexpression von *KNAT2* (Dockx et al. 1996) bzw. *Antisense*-Expression von

AtPHB (Prohibitin-Homolog in *Arabidopsis*) entstand Kallusgewebe (Sun und Goodman, 1996). Für *CycD3* konnte gezeigt werden, dass durch eine Erhöhung der Cytokininkonzentration auch die Expression von *CycD3* ansteigt (Soni et al. 1995).

1.2 An Teilung und Differenzierung beteiligte Phytohormone

1.2.1 Cytokinine

1.2.1.1 Wirkungen der Cytokinine

Cytokinine spielen eine zentrale Rolle bei vielen Entwicklungsprozessen in Pflanzen. Zu den physiologischen Wirkungen der Cytokinine gehören die Induktion der Samenkeimung, die Ausbildung und Entwicklung von Knospen, die Kontrolle der apikalen Dominanz, die Blütenbildung, die Blattexpansion, die Entwicklung von Chloroplasten, die Chlorophyllsynthese, die Verzögerung der Seneszenz und die Inhibierung des Wurzelwachstums (Binns 1994, Mok 1994). Die wohl wichtigste Bedeutung liegt in der Kontrolle von Zellteilung und –differenzierung, wobei die Cytokinine mit anderen Pflanzenhormonen wechselwirken.

1.2.1.2 Biochemie, Synthese und Katabolismus der Cytokinine

Alle bisher bekannten in Pflanzen vorkommenden Cytokinine sind N⁶-substituierte Adenine (Kaminek 1992). Zeatin (Z), Dihydrozeatin (DZ) und Isopentenyladenin (2iP) sind die am häufigsten in Pflanzen vorkommenden Cytokinine. Die freien Basen der Cytokinine und ihre Riboside (ZR, DZR, 2iPR) werden als die biologisch aktiven Komponenten angesehen, während N-Glukoside nur eine geringe biologische Aktivität besitzen und eine Rolle beim Transport und der Inaktivierung der Cytokinine spielen (Jameson 1994, Letham 1994).

Die ersten bekannten Biosynthesegene von Cytokinin in Pflanzen wurden von Takei et al. (2001) und Kakimoto (2001) durch vergleichende Analyse des *Arabidopsis* Genoms mit der IPT Aminosäuresequenz von *Agrobacterium* identifiziert. Transgene *E. coli*, die *AtIPT1-AtIPT8* exprimierten, sezernierten, mit Ausnahme von *AtIPT2*, Cytokinin ins Medium. Das aufgereinigte rekombinante Protein AtIPT1 katalysierte die Synthese von iPMP (Isopentanyladenosen 5'-monophosphat) aus AMP und DMAPP (Dimethylallylpyrophosphat) (Takei et al. 2001). Rekombinantes AtIPT4 hingegen katalysierte den Transfer einer Isopentenylgruppe von Dimethylallyldiphosphat auf ADP oder ATP als Substrat (Kakimoto, 2001), jedoch nicht von AMP.

Das Cytokininoxidasegen (*CKX*) aus *Zea mays* (*ZmCKX*) wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen identifiziert (Morris et al. 1999, Houba-Hérin et al. 1999). Sie ist für die

irreversible Degradation der Cytokinine durch Entfernung der N⁶-Isopentenyl-Kette verantwortlich und hat somit Einfluß auf die endogene Cytokininkonzentration (Witty und Hall 1974, Armstrong 1994). Die Cytokininoxidaseaktivität konnte von Morris et al. (1999) und Houba-Hérin et al. (1999) nachgewiesen werden. Werner et al. (2001) transformierten Tabak mit *AtCKX1-AtCKX4* unter der Kontrolle eines 35S Promotors und konnten neben der Cytokininoxidaseaktivität eine Reduktion der Cytokininkonzentration in Tabakpflanzen messen.

1.2.1.3 Transgene Pflanzen

Durch die Herstellung transgener Pflanzen konnte die Cytokininkonzentration direkt im Gewebe geändert werden. Transgene Pflanzen mit dem *ipt*-Gen (aus *Agrobacterium tumefaciens*) unter der Kontrolle des eigenen Promotors konnten nicht regeneriert werden, da die Wurzelbildung unterdrückt war (Medford et al. 1989). Die basale Expression des *ipt*-Gens unter der Kontrolle des *hsp70* Promotors aus *Drosophila* führte zu einer Hemmung des Wurzelwachstums in transgenen Tabakpflanzen (Schmülling et al. 1989). Durch Verwendung eines auxin-induzierbaren Promotors konnten typische Cytokinineffekte in den transformierten Tabakpflanzen herbeigeführt werden, vor allem in Organen, in denen Auxine wirken (Li et al. 1992). Zudem bildeten sich an Blattadern und Petiolen ektopische Sprosse. Ektopische Sprosse können auch durch exogene Applikation von Cytokininen auf abgeschnittenen Blättern von *Begonia rex* hervorgerufen werden (Chylah-Arnason und Tran Than Van 1968). Werner et al. (2001) gelang es zum ersten Mal, die endogene Cytokininkonzentration in *Nicotiana tabacum* zu senken, indem sie Tabakpflanzen mit vier verschiedenen Konstrukten der Cytokininoxidasegene (*AtCKX1-AtCKX4*) von *A. thaliana* unter der Kontrolle des 35S Promotors transformierten. Die Anzahl der Blattzellen sank auf 4% im Vergleich zu WT Pflanzen. Die Wurzelmeristeme waren vergrößert und führten zu einem schneller wachsenden und verzweigteren Wurzelsystem, was die wichtige Rolle der Cytokinine bei Zellteilungsprozessen unterstreicht.

1.2.1.4 Mutanten mit verändertem Cytokiningehalt oder veränderter Cytokininantwort

Die Arabidopsis-Mutante *amp1* (*altered meristem program1*) enthält eine vier- bzw. siebenfache erhöhte Zeatin- sowie Dihydrozeatinkonzentration (Chaudhury et al. 1993). Der Phänotyp von *amp1* korreliert mit dieser erhöhten Cytokininkonzentration. Neben einer reduzierten Apikaldominanz und der erhöhten Regenerationsfähigkeit von Wurzelexplantaten zu Sprossen in Gewebekultur zeigen die Pflanzen auch eine konstitutive Photomorphogenese (Chin-Atkins et al. 1995). Helliwell et al. (2001) klonierten *AMP1*, welches wahrscheinlich für eine Glutamat Carboxypeptidase kodiert.

Bisher sind schon einige Mutanten mit einer verringerten Sensitivität zu Cytokinin identifiziert worden, die Einblick in die Signalperzeption und –transduktion der Cytokine geben können.

Die *cyr1* Mutante (*cytokinin resistant1*) von *Arabidopsis thaliana* hat kleinere Blätter und ein verringertes Sprosswachstum. Die Wurzeln wachsen auch auf bei WT hemmenden Cytokininkonzentrationen (Deikman und Ulrich 1995). In *Nicotiana tabacum* führen Mutationen in den Loci *zea1-zea3* zu einer Hypertrophie von Hypokotyl und Sprossen nach Cytokiningabe (Jullien et al. 1992, Nogué et al. 1995, Martin et al. 1997).

Bei mehreren cytokinininsensitiven Mutanten ist die Zellelongation verändert. So zeigt die Mutante *stp1* (*stunted plant1*) neben einer ausbleibenden Reduktion des Wurzelwachstums auf inhibierenden Cytokininkonzentrationen auch eine reduzierte Elongation von Wurzelzellen (Baskin et al. 1995). Die *Petunia hybrida*-Mutante *tra1* hat eine verringerte Zellelongation und zudem ein verstärktes Wachstum bei hohen Cytokininkonzentrationen (Dubois et al. 1996).

Einige der cytokinininsensitiven Mutanten weisen auf die Wechselwirkung zwischen Cytokinin und Hormonen anderer Phytohormonklassen hin. So war die *ckr1* Mutante von *Arabidopsis thaliana* allelisch zu (*ein2*) *ethylene insensitive2* (Su und Howell 1992, Cary et al. 1995). Die *ckr1* (*cytokinin resistant1*) Mutante aus *Nicotiana plumbaginifolia* war in der Synthese von Abscisinsäure gestört (Blonstein et al. 1991, Parry et al. 1991). Von den Mutanten *cin1-cin5* (*cytokinin insensitive1-5*) konnte für *cin4/cop1/fus9* und *acs5/cin5* eine Genfunktion in der Photomorphogenese bzw. ein Ausfall der ACC-Synthase in der Ethylenbiosynthese gezeigt werden (Vogel et al. 1998a, Vogel et al. 1998b).

Dieses Jahr gelang es Inoue et al. (2001) einen Cytokininrezeptor (CRE1) zu identifizieren. *cre1* Hypokotylexplantate zeigten eine stark verringerte Proliferation auf Cytokininmedium in Gewebekultur. CRE1 besitzt zwei Transmembrandomänen und weist Ähnlichkeiten zu Histidinkinasen der Familie der Ethylenrezeptoren und dem osmosensorischen Protein ATHK1 auf. Die Funktionsfähigkeit des Cytokininrezeptors wurde durch heterologe Komplementation in Bakterien und Hefe gezeigt. Hefemutanten, denen die endogene Histidinkinase SLN1 fehlte und die CRE1 exprimierten, konnten durch exogene Cytokiningabe komplementiert werden (Inoue et al. 2001). Die Sensitivität gegenüber Cytokinin wurde in transgenen *E. coli* durch Expression von CRE1 und einem *cps::lacZ* Fusionsgen gezeigt (Suzuki et al. 2001). Das *capsular polysaccharide synthesis* (*cps*) Operon kann durch eine Signalkaskade beginnend mit dem RcsS Rezeptor aktiviert werden. In *E. coli* gibt es ca. 40 unterschiedliche Signalketten von Zweikomponentensystemen, von denen einer vom RcsS Rezeptor abhängig ist, der Ähnlichkeiten mit CRE1 aufweist. Durch

Ausnutzung dieses Signaltransduktionsweges konnte in *RcsS* deletierten Stämmen durch Expression von *CRE1* Cytokinin aufgrund der Aktivierung der Expression der β -Galactosidase detektiert werden (Suzuki et al. 2001). *CRE1* ist allelisch zu *WOODEN LEG* (*WOL*) (Scheres et al. 1995). *wol* wurde als Mutante mit verändertem Vaskularsystem der Wurzel und infolgedessen reduziertem Wurzelwachstum isoliert (Scheres et al. 1995). Dabei zeigte sich, dass in *wol* bestimmte Zellteilungen in Wurzel und Hypokotyl während der späten Embryogenese ausbleiben. Dies führt dazu, dass nur Protoxylem in der Wurzel ausgebildet wird, aber kein Metaxylem oder Phloem (Mähönen et al. 2000, Scheres et al. 1995). Interessanterweise bildet *wol/cre1* normale Sprosse. Es wurde argumentiert, dass *CRE1* eine spezifische Funktion in Gewebekultur hat, dass jedoch weitere Rezeptoren in der Pflanzenentwicklung den Ausfall von *CRE1* übernehmen könnten (Schmülling 2001). Neben *CRE1* sind noch die Histidinkinasen *AHK2* und *AHK3* an der Cytokininperzeption beteiligt (T. Mizuno, persönliche Mitteilung). Kakimoto (1996) isolierte durch die Methode des *activation tagging* *CKI1* und *CKI2* (*CYTOKININ INDEPENDENT1,2*). Dabei transformierte er Kallusgewebe aus Hypokotyl mit *Enhancer*-Elementen, die zu einer dominanten Mutation führten. *cki1* und *cki2* Kalli ergrüneten, proliferierten stärker als WT und bildeten auch auf hormonfreiem Medium Sprosse. Die Sequenz des *CKI1* Gens weist wie *CRE1* eine hohe Homologie zu Histidinkinasen des Zweikomponentensystems aus Bakterien und Hefe auf. Primäre Antwortgene von Cytokinin wurden von zwei unabhängigen Forschergruppen identifiziert (Taniguchi et al. 1998, Brandstatter und Kieber 1998). Taniguchi et al (1998) konnten durch exogene Applikation von Cytokinin eine 4-8 fache Induktion der Expression von einem Teil der *ARR* Gene (*Arabidopsis response regulator*) nach 30 min und bei einem weiteren Teil nach 3-6 Stunden feststellen. Die von Brandstatter und Kieber (1998) gefundenen *IBC6* und *IBC7* Gene erwiesen sich als allelisch zu *ARR5* bzw. *ARR4*. Die schnelle Antwort von *IBC6/ARR5* war sehr spezifisch, denn sowohl Licht als auch andere Hormonklassen hatten keinen großen Einfluss auf die Expression. Weitere Gene der *ARR* Genfamilie konnten durch Sequenzhomologien zu *Response Regulatoren* des Zweikomponentensystems in Bakterien identifiziert werden und Fähigkeit zum His-Asp-Phosphoryl-Transfer *in vitro* wurde nachgewiesen (Imamura et al. 1998).

1.2.2 Auxine

1.2.2.1 Wirkung der Auxine

Auxine regulieren die Zellteilung, sowie Wachstums- und Differenzierungsprozesse in Pflanzen (Hobbie et al. 1994). Sie beeinflussen nahezu jeden Aspekt der Pflanzenentwicklung, z.B. sind sie maßgeblich an der Steuerung der apikalen Dominanz, der Entstehung von Seitenwurzeln und des Gravitropismus beteiligt.

1.2.2.2 Biochemie, Synthese und Katabolismus

Indol-3-Essigsäure (IAA) ist der wichtigste Vertreter der Auxine in höheren Pflanzen. Es werden zwei unterschiedliche IAA-Synthesewege, ein tryptophan-abhängiger und ein tryptophan-unabhängiger, diskutiert (Bartel 1997). Normanly et al. (1993) konnte durch ¹⁵N markiertes Indol-3-Acetonitril (IAN) zeigen, dass in *Arabidopsis* IAN eine wichtige Vorstufe von IAA darstellt. In *Arabidopsis* konnten bisher vier Nitrilase-Gene identifiziert werden, die gewebespezifisch und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der pflanzlichen Entwicklung exprimiert werden (Bartling et al. 1994, Bartel und Fink 1994). Die Auxinkonzentration kann aber auch über Konjugation mit Peptiden oder Kohlenhydraten, sowie durch den Katabolismus der Auxine reguliert werden (Bartel 1997).

Bisher wurden in *Arabidopsis* zwei Mutanten beschrieben, die Auxin überproduzieren. Die *sur1/rty* Mutante wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen isoliert (Boerjan et al. 1995, Celenza et al. 1995, King et al. 1995, Lehman et al. 1996) und weist einen mehr als zehnfach erhöhten Gehalt an freiem und konjugiertem IAA auf. Die verstärkte Wurzel- und Kallusbildung, die am Wurzelhals beginnt und die gesamte Pflanze erfasst, kann auch durch exogene Applikation an WT Pflanzen erzeugt werden (s. Tumorbildung in Pflanzen). Die Mutante *sur2* bildet wie die *sur1/rty* Mutante vermehrt Wurzeln und die endogene Auxinkonzentration ist erhöht. Im Gegensatz zu *sur1* wird jedoch kein Kallus ausgebildet (Delarue et al. 1998). *SUR2* wurde von Barlier et al. (2000) via *Transposon-tagging* kloniert und kodiert das Protein CYP83B1, das zur Familie der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen gehört. Cytochrom P450 Enzyme sind an vielen Sekundärstoffwechselwegen beteiligt, darunter auch Biosynthesewege von Pflanzenhormonen, wie Jasmonaten, Gibberellinen und Brassinosteroiden. Hull et al. (2000) identifizierten zwei *Cytochrom P450* Gene, die für Proteine kodieren, die mit dem Indol-Acetonitril-abhängigen IAA Biosyntheseweg in Verbindung gebracht werden können. Für CYP83B1 wird deshalb auch eine Beteiligung an der Synthese von Auxinen diskutiert (Barlier et al. 2000).

1.2.2.3 Transport der Auxine

Durch den polaren Transport von Auxinen können Organe in der Pflanze, die nicht in der Lage sind genügend Auxin zur Aufrechterhaltung von Wachstum und Entwicklung zu synthetisieren, mit IAA versorgt werden. Außerdem kann durch den mittels polarem Transport erzeugten IAA-Gradienten die apikal-basal Achse des Embryos (Schiavone und Racusen, 1997, Hadfi et al. 1998), die Entwicklung des Vaskularsystems (Hardtke und Berleth 1998) und die Apikaldominanz reguliert werden (Ruegger et al. 1997). Es sind mehrere Gene isoliert worden, die an Regulation oder Katalyse des Auxin-Effluxes beteiligt sind. Mutationen im *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE3 (TIR3)* Gen führen zu einer starken Reduktion des Lateralwurzelswachstums und der Apikaldominanz. TIR3 ist an der Bindung des Auxintransport-Inhibitors NPA beteiligt (Ruegger 1997). Eine Mutation in der regulatorischen Untereinheit A der Proteinphosphatase 2A führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber NPA (Garbers et al. 1996). *pin1* Mutanten haben unverzweigte Infloreszenzstrukturen und sind nicht in der Lage Blüten auszubilden. Das PIN1 Protein ist ausschließlich in der basalen Membran epidermal-kortikaler Zellen lokalisiert und könnte somit eine Transmembrankomponente für einen Auxineffluxtransporter bilden (Galweiler et al. 1998).

1.2.2.4 Mutanten mit veränderter Auxinsensitivität

Mit Hilfe von Mutanten, die eine veränderte Sensitivität zu Auxinen aufwiesen, konnten in den letzten Jahren Komponenten der Signaltransduktion von Auxinen identifiziert werden. Insbesondere eine verringerte Hemmung der Wurzelelongation auf Medien mit inhibitorischen Auxinkonzentrationen wurde als Kriterium zur Isolierung von Auxinsensitivitätsmutanten verwendet. *auxin resistant1 (axr1)* Mutanten zeigen einen pleiotropen Phänotyp mit einer verlängerten Wurzel, einer verringerten Lateralwurzelzahl und einem Verlust der apikalen Dominanz. *AXR1* kodiert eine wichtige intrazelluläre Komponente des Auxin-Signaltransduktionswegs, denn *axr1* kann alle phänotypischen Effekte einer Überexpression des *iaaM* Gens blockieren, obwohl eine erhöhte endogene IAA-Konzentration vorhanden ist (Romano et al. 1993). Es ist auch wahrscheinlich, dass *AXR1* an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist, da *axr1* Mutanten weniger Zellteilungen als WT Pflanzen durchlaufen (Lincoln et al. 1990). *AXR1* weist Ähnlichkeiten zum Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 auf. *AXR1* und *ECR1* können gemeinsam Mitglieder der RUB/NEDD8 Familie Ubiquitin-verwandter Proteine aktivieren (del Pozo et al. 1998, del Pozo und Estelle 1999).

Mutationen im *AUX1* Gen führen zu einer verringerten Ausbildung von Lateralwurzeln und zu Agravitropismus der Wurzel (Maher und Martindale 1980, Hobbie und Estelle 1995). Das *AUX1* Gen kodiert ein hydrophobes Polypeptid, das Ähnlichkeiten zur Familie der Aminosäure-Permeasen aufweist (Bennett et al. 1996). Möglicherweise stimuliert das *AUX1* Protein die Lateralwurzelsbildung, indem es die Aufnahme von Auxin in sich teilende Perizykelzellen erleichtert (Bennett et al. 1998).

Die dominanten *axr2* Mutanten sind zwergwüchsig und haben kleinere Zellen, was auf einen Defekt in der Zellelongation hindeutet (Wilson et al. 1990, Timpte et al. 1994). Semidominante *axr3* Mutanten zeigen eine veränderte Auxinsensitivität. Die Mutanten wiesen eine vergrößerte Apikaldominanz, vermehrte Adventivwurzelsbildung, ein auxinresistentes Wurzelwachstum und einwärts gebogene Blätter auf (Leyser et al. 1996). Die *axr4* Mutante unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Mutanten, da sie spezifisch gegen Auxin resistent ist und keine veränderten Reaktionen auf andere Phytohormone aufweist (Wilson et al. 1990, Lincoln et al. 1990, Pickett et al. 1990). Der Defekt im *AXR4* Gen führt zu einem agravitropen Wurzelwachstum und einer Reduktion der Lateralwurzelsbildung (Hobbie und Estelle 1995).

1.2.2.5 Frühe Gene der Auxinantwort

Bisher konnten in *Arabidopsis* folgende Genfamilien von Auxin *early response* Genen identifiziert werden: Die *SAUR-AC1* Familie, die *GH3*-Familie, Mitglieder der *Aux/IAA*-Familie und die *ACS*-Genfamilie, die für ACC Synthesen kodieren (Abel et al. 1995, Abel und Theologis, 1996). Es gibt mehrere Hinweise, die darauf hindeuten, dass diese „*early response*“ Gene direkte Ziele der Auxinsignaltransduktion sind (Abel et al. 1995). Zum einen werden sie schon nach 4 bis 30 min exprimiert, die Expression kann durch Cycloheximid nicht unterbunden werden. Außerdem ist die mRNA Abundanz dieser *early response* Gene in *aux1*, *axr1* und *axr2* vermindert (Timpte et al. 1995, Abel et al. 1995).

Die *Aux/IAA*-Genfamilie besteht aus mindestens 20 Mitgliedern, wobei die *IAA* Gene 4 konservierte Domänen, die als Box I-IV bezeichnet werden, eine NLS und eine amphipathische $\beta\alpha\alpha$ -Faltblattstruktur aufweisen, wie sie in Repressorproteinen bei Prokaryoten zu finden ist. Die Boxen III und IV sind zur Ausbildung von Homo- und Heterodimeren verantwortlich (Kim et al. 1997). Abel und Theologis (1996) vermuten, dass die im Kern lokalisierten *IAA* Proteine Transkriptionsfaktoren sind. Rouse et al. (1998) klonierten *AXR3* und konnten zeigen, dass es identisch mit *IAA17* ist.

Bisher wurden ca. 10 *AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF)* Transkriptionsfaktoren identifiziert (Guilfoyle et al. 1998). Deren N-terminale Domäne kann an ARE (*auxin-response elements*) Promotorelemente binden, die in vielen auxin-regulierten Genen vorkommen. Außerdem besitzen sie wie die *IAA*-Gene Box III- und Box IV-Motive. Die Interaktion

zwischen ARF- und IAA-Proteinen konnte im *yeast two-hybrid system* gezeigt werden (Ulmasov et al. 1997). Die *monopteros (mp)* Mutationen, die allelisch sind zu *IAA24* bzw. *ARF5*, führen zu einem gestörten Auxintransport, zu Defekten in der Differenzierung des Vaskularsystems und der Formation der apikal-basal Achse in frühen Embryos (Przemeck et al. 1996). Semidominante *shy2* Keimlinge haben sowohl im Dunkeln als auch im Licht ein verkürztes Hypokotyl, eingerollte Blätter und blühen früher als Wildtyp (Kim et al. 1996). *SHY2* wurde von Tian und Reed (1999) als *IAA3* identifiziert. Eine Mutation in *ETTIN*, welches *ARF3* kodiert, bewirkt eine gestörte Entwicklung des Floralmeristems und der daraus entstehenden Blütenorgane (Sessions et al. 1997). Diese Ergebnisse zeigen, dass mit zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen, der Genetik und der Molekularbiologie, gleiche Gene eines Signalweges identifiziert werden können.

1.2.3 Wechselwirkung von Cytokinin und Auxin

Skoog und Miller konnten schon 1957 zeigen, dass Cytokinine und Auxine ausreichen, um in einer Gewebekultur von Tabak Zellteilung und Zelldifferenzierung zu initiieren. Dabei spielt das Cytokinin/Auxinverhältnis beim Differenzierungsverhalten des Gewebes eine wesentliche Rolle. Während bei einem niedrigen Cytokinin/Auxinverhältnis die Wurzelbildung gefördert wird, stimuliert ein hohes Cytokinin/Auxinverhältnis die Entstehung von Sprossen. Im Gegensatz dazu kontrollieren Cytokinine und Auxine gemeinsam die Zellteilung. So kommt es bei einem ausgewogenen Verhältnis der beiden Hormone zu einer undifferenzierten Proliferation von Kallusgewebe. Die Wirkungen von Cytokininen und Auxinen sind eng miteinander verzahnt. Ein exogener oder endogener Anstieg der Cytokininkonzentration kann die Konzentration an freiem IAA in Wurzelgewebe bzw. Pflanzen erhöhen (Binns et al. 1987, Bourquin und Pilet 1990, Bertell und Elliasson 1992). Aber auch die Signaltransduktion von Cytokininen kann durch Wechselwirkung mit auxin-abhängigen Signaltransduktionswegen beeinflusst werden. Die auxinresistenten *Arabidopsis*-Mutanten *aux1* und *axr1* (siehe oben) haben beispielsweise auch eine erhöhte Resistenz gegen Cytokinine.

1.3 Kontrolle von Zellteilung und -differenzierung

Der Zellzyklus ist ein Charakteristikum aller lebenden Organismen. In Eukaryoten ist die Phase der DNA-Replikation (entspricht der S-Phase) von der Mitose (M-Phase) durch zwei G-Phasen (G1 und G2) in der Reihenfolge G1-S-G2-M getrennt (Howard and Pelc, 1953). Die Regulation des Zellzyklus ist von zwei cyclin-abhängigen Kinasen (CDK-a und CDK-b) abhängig, die anhand ihrer Bindemotive unterscheidbar sind, sowie Cyclinen, die Komplexe mit den CDKs eingehen und so den G1/S- und G2/M-Übergang kontrollieren (Reichheld et

al. 1996). Während der G1-Phase können unterschiedliche exogene und endogene Signale den Gehalt an D-Cyclinen erhöhen. Diese D-Cycline assoziieren mit CDK-a zu Komplexen (Gaudin et al. 2000, Riou-Khamlichi et al. 1999, Riou-Khamlichi 2000). Die Aktivität dieser CycD-CDK Komplexe kann durch CDK Inhibitoren, wie z.B. ICK1 und ICK2 reguliert werden (Wang et al. 1998, Lui et al. 2000). Eine erhöhte Aktivität des CycD-CDK Komplexes in der späten G1-Phase inaktiviert das Retinoblastoma (Rb) Protein durch Phosphorylierung, welches nun seinerseits einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr aufrecht erhalten kann (De Jager und Murray, 1999). Dadurch werden E2F-regulierte Gene durch E2F aktiviert und können die DNA-Replikation einleiten.

Die Kontrolle des G2/M-Übergangs unterliegt anderen Mechanismen, die wahrscheinlich auch bei Pflanzen konserviert sind. Während der G2-Phase ist der Zellzyklus durch inaktive CycB-CDK Komplexe arretiert. Dies geschieht durch Phosphorylierung der CycB-CDK Komplexe durch die Wee1 Kinase (Sun et al. 1999). Die CDC25 Phosphatase kann den CycB-CDK Komplex aktivieren und für die Mitose spezifische Gene können exprimiert werden (Millar and Russell, 1992). Ayaydin et al. (2000) vermuten, dass noch weitere Phosphatasen (PP1 und PP2A) an der Kontrolle des G2/M-Übergangs beteiligt sind, da eine Inhibierung von Serin/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen durch den Phosphatasehemmer Endothall zu einer verfrühten CDC25 Kinaseaktivität führte.

Die vorgestellte Regulationmaschinerie des Zellzyklus wird ihrerseits durch endogene und exogene Faktoren an den G1/S- und G2/M-Übergängen reguliert. Im folgenden soll vornehmlich auf die bekannten Regulationsmechanismen durch die Phytohormone Cytokinin und Auxin eingegangen werden.

1.3.1 Zellteilungskontrolle durch Cytokinine

Cytokinine können sowohl am G1/S- als auch am G2/M-Übergang als Zellzyklusregulatoren wirken (Soni et al. 1995, Zhang et al. 1996, Redig et al. 1996, Laureys et al. 1998, Sorrell et al. 1999, Riou-Khamlichi et al. 1999). Soni et al. (1995) zeigten, dass die pflanzlichen D-Cycline (*CycD1*, *CycD2* und *CycD3*) in der Lage sind, im heterologen Hefesystem Mutanten mit inaktivierten G1-Cyclinen zu komplementieren. Cytokinine können in Zellkulturen von *Arabidopsis* und *Arabidopsis*pflanzen die *CycD3*-Transkriptmenge erhöhen (Riou-Khamlichi et al. 1999, Soni et al. 1995). *In situ*-Hybridisierungen in *Arabidopsis* haben gezeigt, daß *CycD3* in den proliferierenden Geweben des Sproßmeristems, der Blattprimordien, Achselknospen, im Prokambium und des Vaskulargewebes exprimiert ist. Insbesondere in diesen Geweben war die *CycD3*-Expression nach Cytokinin-Behandlung erhöht (Riou-Khamlichi et al. 1999). Wenn *CycD3* ein primäres Zielgen von Cytokininen ist, sollte durch konstitutive Überexpression von *CycD3* in *Arabidopsis* Gewebe Cytokinin zur Initiierung von

Kallus nicht mehr notwendig sein. Riou-Khamlichi et al. (1999) konnten in stabilen *Arabidopsis* Transformanten, die *CycD3* unter einem 35S Promotor exprimierten, cytokinin-unabhängige Kallusbildung an Blattstücken beobachten.

Cytokinine können auch den Übergang von der G2-Phase in die Mitose steuern. Zellen von bestimmten Suspensionskulturen arretieren in der G2-Phase, wenn ihnen Cytokinin fehlt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen inaktive CDK Komplexe besitzen (Zhang et al. 1996). Synchronisierte BY2-Tabakzellen können durch Zugabe von Lovastatin, einem Inhibitor der Cytokininsynthese arretiert werden und durch exogene Cytokiningabe zur Initiierung der Mitose gebracht werden (Laureys et al. 1998). Außerdem akkumulieren synchronisierte Tabak-Suspensionszellen am G2/M-Übergang Zeatin und weitere Cytokinine (Redig et al. 1996).

1.3.2 Zellteilungskontrolle durch Auxine

Wird Auxin exogen appliziert, so erhöht sich in Wurzeln von *Arabidopsis* die *Cdc2a*-Expression um den Faktor zwei (Hemerly et al. 1993). Sowohl Auxin als auch Cytokinin sind in der Lage, in Protoplasten aus Mesophyllzellen *Cdc2a*-Expression zu induzieren, jedoch können nur beide Hormone gemeinsam die Zellteilung auslösen (Hemerly et al. 1993). Die Auxinbehandlung aktiviert die Bildung von CDK-Komplexen (Magyar et al. 1993) und fördert den ubiquitin-vermittelten Abbau von CDK-Inhibitoren (del Pozo und Estelle 1999).

1.3.3 Weitere Zellzykluskontrollfaktoren

Neben Cytokinin und Auxin sind noch weitere Phytohormone an der Zellzykluskontrolle beteiligt. In Reis-Internodien, die mit Gibberelin behandelt wurden, kann eine vermehrte Expression von *Cdc2* und Cyclin-Genen beobachtet werden (Sauter et al. 1995, Sauter et al. 1997). Wang et al. (1998) berichten, dass das Gen *ICK1* durch Abscisinsäure induziert wird. *ICK1* interagiert mit *CycD3* und *Cdc2a* und blockiert so den G1/S-Übergang (Wang et al. 1998).

Neben Phytohormonen konnte kürzlich auch Glutathion (GSH) als Regulator der G1/S-Transition bestimmt werden. Das von Vernoux et al. (2000) klonierte *ROOTMERISTEMLESS* (*RML*) kodiert eine γ -Glutamylcysteinsynthetase, die den ersten Schritt im GSH Biosyntheseweg katalysiert. Eine Verringerung der intrazellulären GSH Konzentration durch Zugabe eines GSH Inhibitors der GSH Biosynthese in *Arabidopsis*- und Tabakkeimlingen, sowie BY2 Tabakzellkulturen inhibiert die Zellteilung. Interessanterweise ist diese Inhibierung auf das Wurzelmeristem beschränkt (Vernoux et al. 2000).

Das *PROLIFERA*-Gen (*PRL*) aus *Arabidopsis* kodiert ein MCM2-3-5-Homolog, welches in Säugetieren vergleichbar mit E2F nach Auflösung des MCM2-3-5/Rb Komplex mit dem hyperphosphorylierten Rb-Protein die DNA-Replikation einleiten kann (Springer et al. 1995). Durch *PRL::GFP* Gene konnte in *Arabidopsis* Zellkulturen gezeigt werden, dass das *PRL::GFP*-Fusionsprotein in der G1-Phase akkumuliert und während der Mitose verschwindet, um dann in Tochterzellen in der G1-Phase wieder zu akkumulieren (Springer et al. 2000).

Die *pasticcino* (*pas*) Mutanten entwickeln Sprossmeristeme mit unregelmäßigen, vitrifizierten Blättern an denen defekte ektopische Sprosse entstehen (Faure et al. 1998). Die Organe der Pflanzen sind zum Teil miteinander verwachsen. Die *pas* Mutanten weisen ein stark gestörtes Wurzelsystem auf. Auf cytokininhaltigem Medium hypertrophieren die apikalen Organe. Faure et al. (1998) konnten zeigen, dass die Adhäsion zwischen einzelnen Zellen gestört ist. Zudem sind in der Epidermis ektopische perikline Zellteilungen und im Hypokotyl zusätzliche Zellschichten gefunden worden. Das von Vittorioso et al. (1998) klonierte *PAS1* Gen kodiert ein Protein mit hoher Homologie zu Immunophilinen. *PAS1* wird in der ganzen Pflanze exprimiert, wobei die Transkriptmenge durch exogene Applikation von Cytokinen deutlich ansteigt.

1.4 Ziele der Arbeit

Die zentrale Bedeutung von Cytokinen und Auxinen bei Zellteilung und Zelldifferenzierung in Pflanzen ist in zahlreichen Experimenten gezeigt worden (Binns 1994, Mok 1994). Es konnten aber bisher nur wenige Faktoren identifiziert werden, die die Kontrolle dieser Hormone an Teilungs- und Differenzierungsprozessen in der pflanzlichen Zelle vermitteln. Die Isolierung von Mutanten mit einer veränderten Antwort auf Hormone ist ein vielversprechender Ansatz, um Einblick in die Signaltransduktionswege von Hormonen in Pflanzen zu erhalten. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, Mutanten zu isolieren, die in Abhängigkeit von Cytokinin und Auxin einen Defekt in der Zelldifferenzierung zeigen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden EMS-induzierte Mutanten auf eine Kallusbildung in Gewebekultur, abhängig von niedrigkonzentriertem Cytokinin/Auxinmedium, gescreent. In weiterführenden Untersuchungen wurden die Mutanten genauer charakterisiert. Neben der genetischen Analyse wurden auch phänotypische und histologische Untersuchungen durchgeführt und Wachstumsparameter der Mutanten bestimmt. Außerdem wurden Änderungen der Hormonsensitivität der Mutanten in Bezug auf Zellteilungs- und Zelldifferenzierungsvorgänge untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden gezielt Mutationen in Genen gesucht, deren Ausfall möglicherweise eine Dedifferenzierung von Pflanzengewebe verursachen könnte. Dazu wurden die *AtCKX* Gene ausgewählt, da sie eine entscheidende Rolle beim Abbau von Cytokininen spielen (Bilyeu et al. 2001, Werner et al. 2001). Ein Ausfall eines *AtCKX* Gens könnte zu einer Erhöhung der endogenen Cytokininkonzentration führen und so eine verstärkte Zellproliferation oder veränderte Differenzierung auslösen. Die Isolierung von *Knock-out* Zelllinien aus verschiedenen T-DNA und Transposon-getaggen Mutantenkollektionen nahm dabei großen Raum ein. Die gefundenen homozygoten *Atckx Knock-out* Mutanten wurden einer ersten phänotypischen Analyse unterzogen und zudem auf eine veränderte Hormonsensitivität getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzliches Material

2.1.1 Ökotypen

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Ökotyp Col-1 *gl1* (Lehle Seeds, Tucson, USA) wurde als Wildtypkontrolle und für Rückkreuzungen eingesetzt.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Ökotyp Ler (Lehle Seeds, Tucson, USA) wurde für Kartierungskreuzungen mit den *tup* Mutanten verwendet.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Ökotyp WS1 (Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University, USA) wurde als Wildtypkontrolle für die T-DNA mutagenisierten Linien und für Rückkreuzungen dieser Linien eingesetzt.

2.1.2 Mutantenlinien

Mutagenisierte Samenpopulationen

Die für den Kallusscreen verwendeten Mutantenlinien von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Col-1 *gl1* waren die M2 Generation von EMS-mutagenisierten Samen, die Markus Frank generiert hatte (Frank 1999). Ca. 500 dieser M2 Linien waren zuvor auf *tsd* Phänotypen gescreent worden, weitere ca. 900 M2 Linien wurden zum ersten Mal gescreent.

Mutanten

Die Mutante *amp1* (Chaudhury et al. 1993) wurde vom Nottingham Stock Center, England, bezogen (Ökotyp Ler). Samen der Mutante *sur1* (Boerjan et al. 1995) wurden von Wout Boerjan (Universität Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die *tsd1* und *tsd2* (Ökotyp Col-1 *gl1*) Mutanten stammten von Markus Frank (Frank 1999).

En1 Insertionslinien

Die *En1* induzierten Mutantenlinien (Wisman et al. 1998) wurden von Elvira Baumann und Teresa Mozo, ZIGIA (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt. Die Insertionslinien für *ckx2* hatten die Chargennummern 15190 und 6AA129, für *ckx3* Nr. 17435 und Nr. 7AT50, und für *ckx4* Nr. 6AR92, Nr. 7AAQ88 und Nr. 6AAI60.

T-DNA Insertionsmutanten

Die mit dem Vektor pD991 transformierten T-DNA Mutantenlinien *ckx2*, *ckx3*, *ckx4* und *ckx5* wurden aus den 225er Pools mit den Akzessionsnummern CSH132, CSH180, CSH171 und

CSH8 identifiziert. Diese waren vom Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC: <http://aims.cse.msu.edu/aims>) bezogen worden. Der positive Neunerpool war für *ckx2* Nr. CSH132/3262, für *ckx3* Nr. CSH180/4484 und für *ckx5* Nr. CSH8/189.

Promotor-GUS-Linien

DR5::GUS-transgene Pflanzen wurden von Tom Guilfoyle (University of Missouri, Columbia, USA) (Ulmasov et al. 1997), *ARR5::GUS*-transgene Pflanzen von Joe Kieber (University of North Carolina, Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt (Brandstatter und Kieber, 1998). Die Linie *FA4C* (= transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit modifiziertem *CycB1::GUS*-Konstrukt und *destruction box* vor *GUS* Gen) wurde von Peter Doerner (Salk Institute, La Jolla, USA) bezogen (Colón-Carmona et al. 1999). Die *KNAT1::GUS*-transgenen Pflanzen (Ökotyp Col-1) stammten von Sarah Hake (Plant Gene Expression Center, Albany, USA).

2.1.3 Pflanzenanzucht auf Erde

2.1.3.1 Kultivierungsbedingungen in der Klimakammer

Zur Pflanzenanzucht wurde das Rinden-Torf-Substrat Forestina RTS-P und das Instant Kultursubstrat TKS1 der Firma Floragard verwendet. Die Kultivierungsbedingungen waren 20°C, 16 Stunden Licht (ca. 20 000 - 30 000 Lux) mit einer achtstündigen Dunkelperiode. Die Kulturen wurden alle 2-4 Tage bewässert.

Keimlinge und Pflanzen aus *in vitro* Kultur wurden nach ca. 15 Tagen auf Erde transferiert und drei Tage unter transparenten Plastikhauben gehalten. Verblühte Pflanzen wurden nicht mehr bewässert. Zur Samengewinnung wurde eine Tüte über die gesamte Pflanze gestülpt und die Samenreife abgewartet. Die Samen wurden gesiebt, um sie von Pflanzenteilen und Erde zu trennen.

2.1.3.2 Kreuzungen

Die weiblichen Kreuzungspartner wurden durch Entfernung der noch unreifen Staubblätter emaskuliert und die Stempel mit Pollen des männlichen Kreuzungspartners bestrichen. Die so behandelten Blüten wurden mit einem farbigen Bindfaden markiert. Es war darauf zu achten, dass der Stempel deutlich sichtbare Papillen entwickelt hatte. Alle Arbeitsschritte wurden unter dem Binokular unter Zuhilfenahme einer Dumont-Pinzette Nr.5 vorgenommen. Um sicherzugehen, daß mindestens eine Kreuzung mit einer heterozygoten Pflanze erfolgt war, wurden mindestens fünf Parallelkreuzungen mit Pflanzen unbekanntem Genotyps, die jedoch alle Nachkommen einer nachweislich heterozygoten Pflanze waren, durchgeführt.

Waren die Schoten herangereift, wurden sie mit Tesafilm versiegelt. Dadurch konnten die aus der Kreuzung entstandenen Samen zusammen mit allen anderen Samen geerntet werden.

Der Kreuzungserfolg konnte, sofern Col-1 *gl* als weiblicher Kreuzungspartner verwendet wurde, in der F1-Generation anhand des Auftretens von Blatthaaren überprüft werden. Das Gen *GL1* kontrolliert die Entstehung von Blatthaaren. Das Wildtypallel ist gegenüber der *gl1* Mutation dominant.

Erst in der F2-Generation konnte durch das Auftreten von Phänotypen entschieden werden, ob tatsächlich ein heterozygoter Kreuzungspartner verwendet wurde. Alternativ konnte auch der heterozygote Zustand der Kreuzungspflanze im Vorfeld direkt nachgewiesen werden. Dazu mußte gezeigt werden, daß durch Selbstung entstandene Samen dieser Pflanze für den Mutantenphänotyp segregieren (Müller 1961).

2.1.3.3 Schädlingsbekämpfung

Gegen Blattläuse wurde einmalig 0,01 % Confidor (Firma Bayer) ins Gießwasser gegeben. Nematoden der Art *Steinernema feltiae* wurden prophylaktisch gegen einen Sciariden-Befall eingesetzt (Sautter & Stepper, Herrenberg).

2.1.4 Pflanzenkultur *in vitro*

2.1.4.1 Oberflächensterilisierung der Samen

Calciumhypochlorit-Methode

Die Calciumhypochlorit-Methode ist aufwändiger als die Wasserstoffperoxid-Methode, aber sie erlaubt die Lagerung der Samen für mehrere Monate in einer sterilen Petrischale (möglichst im Kühlraum bei 4° C). Die Keimfähigkeit der Samen nimmt danach jedoch ab.

Zur Oberflächensterilisierung wurden die Samen 1 min in 1 ml 0,1% Triton X-100, 4 min in 1 ml 95% Ethanol (in 0,1% Triton X-100) und 7 min in 1 ml einer gesättigten, filtrierten Calciumhypochloritlösung (in 0.1 % Triton X-100) auf dem Schüttler inkubiert. Unter der Sterilbank wurden die Samen fünfmal mit 1 ml sterilem H₂O gewaschen.

Wasserstoffperoxid-Methode

Sterilisationslösung:

50% Ethanol, 25% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und 25% H₂O.

Grundsätzlich ist zu beachten, dass nur kleine Samenmengen mit dieser Methode sterilisiert werden sollten, da die Keimfähigkeit der Samen nach der Behandlung schnell abnimmt. Die Samen möglichst innerhalb eines Tages auslegen.

Um die Samen zu sterilisieren, wurden sie mit 1 ml Sterilisationslösung 4 min bei Raumtemperatur vermischt (im Schüttler), dann die überschüssige Lösung abgenommen und an der Sterilbank einmal mit sterilem H₂O gewaschen.

Bei beiden Sterilisationsmethoden wurden die Samen zum Trocknen auf sterile Papierfilter ca. 1 h in den Luftstrom der Sterilbank gelegt.

2.1.4.2 MS-Medium

MS-Salze	4.6 g/l
Myo-Inositol	0.1 g/l
2-(N-morpholino)-Ethansulfonsäure (MES)	0.5 g/l
Saccharose	30 g/l
Thiamin	20 mg/l
Nicotinsäure	1 mg/l
Pyridoxin	1 mg/l
Biotin (gelöst in DMSO)	1 mg/l
Agar Agar (reinst)	9 mg/l

Der pH-Wert von 5,7 wurde mit 1 N KOH eingestellt. Phytohormone oder Antibiotika wurden steril nach dem Autoklavieren zugegeben. Zur Anzucht von Keimlingen auf Festmedium zur Gewinnung von Wurzelmaterial wurde nur 7 g/l Agar verwendet, um die Wurzeln leichter aus dem Medium lösen zu können (Murashige und Skoog, 1962, modifiziert nach Kemper et al. 1992).

2.1.4.3 KS-Medium

Stammlösung NAA: 1mg/ml DMSO
Stammlösung 2iP: 1mg/ml DMSO

Zur Herstellung des KS-Mediums wurde dem MS-Medium nach dem Autoklavieren je 50µl/l NAA- und 2iP-Stammlösung zugegeben und gut gemischt. (Endkonzentration: 0,25µM NAA und 0,27µM 2iP)

2.1.4.4 Kallusscreening

EMS mutagenisierte M2 Samen wurden oberflächensterilisiert und auf hormonfreies Medium zum Keimen ausgelegt. Nach 10 Tagen wurden die Pflanzen unter sterilen Bedingungen in Wurzel, Wurzel/Hypokotyl-Übergang, Hypokotyl, Blätter und Meristem auf feuchtem Filterpapier mit dem Skalpell zerteilt und danach sofort auf KS-Medium überführt. Die Explantate wurden 4 Wochen kultiviert und dann auf Dedifferenzierungsphänotypen untersucht.

2.1.4.5 Induktion von Arabidopsis-Kalli

Zur Kallusinduktion wurden steril angezogene 1 cm lange Wurzelexplantate auf Kallusinduktionsmedium (MS-Medium mit 0,5 mg/l NAA und 0,5 mg/l 2iP) ausgelegt oder auf

doppeltes KS-Medium (MS-Medium mit 0,1mg/l NAA und 0,1mg/l 2iP). Nach wenigen Wochen hatten sich an den Schnittstellen Kalli gebildet. Um die Kalli weiter zu kultivieren wurden sie auf KS-Medium subkultiviert.

2.1.4.6 Dunkelkeimung

Um Samen im Dunkeln keimen zu lassen, wurden diese auf MS-Medium ausgelegt und die Petrischalen mit Aluminiumfolie umwickelt. Dann wurden sie in einen Styroporbehälter, der innen und außen mit Aluminiumfolie verkleidet war, gelegt. Die Petrischalen standen im Behälter senkrecht. Um eine ausreichende Luftzufuhr zu gewährleisten, waren die Petrischalen mit Luftschnitzungen und der Behälter mit lichtundurchlässigen Öffnungen ausgestattet.

2.2 Histologische Methoden

2.2.1 Fixierung von Pflanzengewebe

Zur Fixierung wurde das Pflanzengewebe in Ethanol/Essigsäure (6:1) mindestens 1 h eingelegt. Das Gewebe konnte so mehrere Wochen gelagert werden und für histologische Untersuchungen weiter bearbeitet werden.

2.2.2 DAPI-Färbung von Wurzelspitzen

DAPI-Stammlösung: 100µg DAPI/ml H₂O

Das fixierte Gewebe wurde 10 sec in 70% Ethanol und dann weitere 10 sec in H₂O gewaschen. Danach wurde es 30 min in einer DAPI-Färbelösung (10 µl DAPI-Stammlösung / ml H₂O) inkubiert. Nach diesem Färbeschritt wurde das Gewebe dreimal für jeweils 10 sec in H₂O gewaschen und konnte dann für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden.

2.2.3 Messung des Wurzelmeristems

Um das Wurzelmeristem auszumessen, wurden die Wurzelspitzen der *Arabidopsis*-pflanzen fixiert und mit DAPI gefärbt. Mit DAPI können die Zellkerne unter UV-Lichte bläulich fluoreszierend sichtbar gemacht werden. Länge und Breite des Wurzelmeristems wurde durch den Bereich höchster Fluoreszenz, d.h. höchster Zellkerndichte definiert.

2.2.4 Histochemische GUS-Analysen

Färbelösung:

Stammlösung 1:

20 mM Kalium-Ferricyanid, 50mM Natriumphosphat pH 7, 0.2 % Triton X-100

Stammlösung 2:

20 mM Kalium-Ferrocyanid, 50mM Natriumphosphat pH 7, 0.2 % Triton X-100

Für die Färbelösung werden die beiden Stammlösungen zu gleichen Teilen gemischt und darin 0.5 mg/ml X-GlcA (entspricht einer 1 mM Lösung) unter Rühren und leichtem Erhitzen gelöst.

Die Gewebe werden 1 h bei -20°C in Aceton inkubiert und danach zweimal mit Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen. Zum Entfärben des Pflanzengewebes und zur Aufbewahrung werden die Gewebe in 70 % Ethanol gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Isolierung

2.3.1.1 Isolierung genomischer DNA für die Southern blot-Analyse

(verändert nach Dellaporta et al. 1983)

Lösungen:

Extraktionspuffer: 100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol (pH 8,0)

Um große Mengen (ca. 1-2 mg) genomischer DNA für die DNA-Filterhybridisierung zu isolieren, wurde ca. 1 g Gewebe in flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert und in ein mit 15 ml DNA-Extraktionspuffer gefülltes Corex-Röhrchen überführt. 1 ml 20% (w/v) SDS wurde hinzugefügt und kurz gemischt. Dann wurde die Probe 10 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert. 5 ml einer 5 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) wurden zugegeben und nach invertieren (vorsichtig) 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 40 min bei $20.000 \times g$ in einer Kontron-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter in ein neues Corex-Röhrchen dekantiert, 10,5 ml Isopropanol zugegeben und 30 min bei -20°C inkubiert, um die Nukleinsäuren selektiv zu fällen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei $20.000 \times g$ und 4°C für 15 min wurde das Pellet in 0,7 ml TE resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 2,5 μl RNase (10 mg/ml) in die Lösung wurde die vorhandene RNA bei 10-minütiger Inkubation (37°C) abgebaut. Unlösliche Rückstände lagerten sich durch eine zehnminütige Zentrifugation in einer Eppendorf-Microfuge bei $14000 \times g$ ab und der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 75 μl 3 M Natriumacetat-

Lösung (pH 5,0) und 500 µl Isopropanol nach vorsichtigem Mischen gefällt und durch eine Zentrifugation für 1 min bei 14.000 x g und 4° C in einer Eppendorf-Microfuge pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 70% (v/v) Ethanol gewaschen, in der SpeedVac getrocknet und in 100 µl TE Puffer gelöst.

2.3.1.2 Isolierung von genomischer DNA für die Kartierung

Extraktionspuffer:

200mM Tris-HCl pH 8,0, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS.

Ein junges Blatt wird in ein 1,5 ml Eppendorfcup gelegt und mit einem Pistill 15 sec ohne Puffer mazeriert. Dann werden 700 µl Extraktionspuffer hinzugegeben und die Probe 5 sec im Vortex vermischt. (Nach Zugabe des Extraktionspuffers kann die Probe bei RT längere Zeit stehen). Es schließt sich eine einminütige Zentrifugation mit 14 000 x g in einer Eppendorf Tischzentrifuge an. Danach werden 600 µl Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfcup überführt. Nach Zugabe von 600 µl Isopropanol wird kurz gevortext und eine weitere Zentrifugation von 5 min durchgeführt. Den Überstand vorsichtig abpipettieren und verwerfen, das Pellet an der Luft trocknen und in 100 µl steriles und destilliertes Wasser oder TE Puffer (pH 8.0) resuspendieren. Die DNA ist bei -20°C mehrere Monate haltbar (Li und Chory 1998)

2.3.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Lösung wurde in geeigneter Weise verdünnt und die optische Dichte (OD) im Photometer bei 260 nm und 280 nm gemessen. Für DNA entspricht eine OD_{260} von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml, für RNA entspricht sie einer Konzentration von 40 µg/ml. Bei 280 nm sollte die Absorption für Nukleinsäure-Lösungen mit geringer Verunreinigung durch Proteine etwa 50% der Absorption bei 260 nm betragen.

2.3.2 PCR

2.3.2.1 Standardansatz

Aus genomischer DNA wurde durch folgenden standardisierten PCR-Ansatz mit spezifischen Primern eine gewünschte Sequenz amplifiziert:

Mastermix:

35,8 µl	H ₂ O
5 µl	ExTaq Puffer (10x)
2 µl	3' Primer (100 pM)
2 µl	5' Primer (100 pM)
4 µl	dNTP Mix (2,5 mM)

0,2 µl ExTaq Polymerase (5 u/µl) von Takara (Japan)
je Reaktion 1 µl genomische DNA (100 ng/µl)

PCR- Bedingungen:

1 min 94 °C
1 min 94 °C
30 sec 55 °C (*Annealing* Temperatur)
2 min 72 °C (*Extension* Temperatur)
5 min 72 °C
4 °C konstant
Schritt 2.-4.: 40 Zyklen

Pro PCR wurde 1 µl Proben-DNA in ein Reaktionsgefäß (Multiply-µStrip, Firma Sarstedt) gefüllt und 49 µl *Mastermix* zugegeben. Der Deckel des Gradienten-Mastercycler-Gerätes der Firma Eppendorf wird beheizt, weshalb eine Überschichtung der Proben mit Mineralöl nicht notwendig war. Das entstandene PCR-Produkt wurde in einem 1,2 %igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel aufgetrennt. Um eine DNA-Sonde für Hybridisierungen zu erstellen, wurde die DNA-Bande, die die amplifizierte DNA enthält, ausgeschnitten und mit dem Gel-Extraction Kit (Fa. Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.3.2.2 PCR-Reaktion für die Amplifikation von SSLP-Markern

Abhängig von der Probenanzahl wurde ein Mastermix pro Primerpaar pipettiert:

Pro DNA-Probe:

15,15 µl	Aqua bidest
2 µl	10x Taq Puffer
0,8 µl	dNTPs (5 mM)
0,4 µl	MgCl ₂ (100 mM)
0,25 µl	Primer A (30 µM)
0,25 µl	Primer B (30 µM)
0,15 µl	Polymerase (5 U/µl) (Goldstar, Fa. Eurogenetec)

Als Template wurde jeweils 1 µl Proben-DNA eingesetzt.

Auftrennung der PCR-Produkte der SSLP-Marker:

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 1,5-4%igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen mit 1 x TAE als Elektrophoresepuffer. Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit DNA-Ladepuffer versehen. Als Längenmarker wurde pBR328HaeIII der Firma MBBL auf den Agarosegelen aufgetragen.

Bestimmung der Kartierungsposition:

Der genetische Abstand der kartierten Loci zu den verwendeten Markern wurde mit Hilfe der Kosambi-Funktion (Kornneef und Stam 1992) berechnet.

2.3.3 DNA-Sequenzanalyse

2.3.3.1 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe eines ABI Prism[®] 310 Genetic Analyzer-Sequenzierautomaten der Firma Applied Biosystems unter Verwendung des ABI Prism[®] BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben ermittelt.

2.3.3.2 Computeranalyse von DNA-Sequenzen

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Software-Pakets DNASTAR (Firma Lasergene) sowie DNA- und Protein-Analyseprogrammen, die über folgende Internetseiten zugänglich waren:

DNA-Analyseprogramme:

http://waldo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

Eine Sammlung an Links zu DNA- und Proteinanalyseprogrammen findet sich unter <http://www.arabidopsis.org/links/webtools.html>, sowie <http://www.geocities.com/biosci2000a/biotools.html>

Für Nuklein- bzw. Aminosäuresequenzvergleiche standen die Genbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.gov>), des *Baylor College of Medicine HGSC* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) und der *Lion Bioscience AG* (<http://srs.ebi.ac.uk>) zur Verfügung.

2.3.4 Southern Blot und Hybridisierung mit DNA-Sonden

2.3.4.1 DNA-Transfer auf Nylonmembranen

Lösungen:

20 x SSC: 3.0 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat (pH 7,0)

Der Transfer von Nukleinsäure von Agarose-Gelen auf eine Hybond[™]-Nylonmembran wurde nach der Methode von Southern (1985) durchgeführt (Kapillarverfahren mit 10 x SSC-Puffer, der Transfer erfolgte über Nacht). Vor dem DNA-Transfer mußte das Agarose-Gel 30 min in Denaturierungslösung und anschließend zweimal 30 min in Neutralisierungslösung bewegt werden. Um die Nukleinsäuren auf die Membran zu fixieren, wurde diese luftgetrocknet und die Nukleinsäure mittels UV-Bestrahlung auf dem Filter fixiert. Die optimale Dosis betrug 0.12 J/cm².

2.3.4.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Sonden wurden mit dem „Prime-It II Random primer Kit“ der Firma Stratagene nach Herstellerangaben radioaktiv markiert. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über Sephadex G50 Säulen ("Nick Columns", Firma Pharmacia) nach Herstellerangaben. Die spezifische Aktivität sollte zwischen 5×10^8 und 5×10^9 cpm pro μg eingesetzter DNA betragen (Feinberg und Vogelstein 1983, Herstellerangaben der Firma Stratagene).

2.3.4.3 Hybridisierungen von Filtern

Vorhybridisierung und Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Sonden

Lösungen:

Heringssperma-DNA-Lösung: 10 mg/ml H_2O

Hybridisierungslösung: 0,25 M NaH_2PO_4 (pH 7), 1mM EDTA, 1% (w/v) BSA, 7% (w/v) SDS

Um unspezifische Bindungen der radioaktiven Sonde an die Filter zu minimieren, wurde die Membran 30 min bei 65°C in der Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Anschließend wurde die zuvor 10 min bei 92°C denaturierte und danach auf Eis abgekühlte DNA-Sonde hinzupipettiert. Die Hybridisierung fand bei 65°C statt und dauerte 2-24 h.

Entfernung unspezifisch gebundener Sonden

Zur Entfernung unspezifischer Hybridisierung wurde der Filter jeweils 30 min in 2 x SSC und 1% SDS (w/v) und in 0,2 x SSC und 1% SDS (w/v) bei 65°C gewaschen.

Auswertung der hybridisierten Filter

Die Hybridisierungssignale wurden durch Auflegen eines Röntgenfilmes X-Omat der Firma Kodak, oder durch Scannen mit dem Phosphorimager SI & Image Quant (Amersham Pharmacia Biotech) detektiert.

2.4 Optische Geräte

Binokular (Olympus SZ-60)

Mikroskop (Axioskop MC 100, Fa. Zeiss)

Spiegelreflexkamera (Olympus SC-35/12)

2.5 Stammlösungen und Chemikalien

Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin 50 mg/ml in H_2O

Kanamycin 100 mg/ml in H₂O

Vitamin-Stammlösungen

"Vitamin-Mix" 20 mg/ml Thiamin
 1 mg/ml Nicotinsäure
 1 mg/ml Pyridoxin in H₂O
 Biotin 1 mg/ml in DMSO

Hormon-Stammlösungen

Alle Hormone in DMSO gelöst.
 Kinetin 0,1, 1,0 und 10 mg/ml
 BAP 1 mg/ml
 2iP 1 mg/ml
 NAA 1 mg/ml
 2,4D 1 mg/ml

Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von der Firma Merck bezogen und die Phytohormone, Vitamine, Antibiotika und Medien für die Pflanzenkultur von der Firma Sigma.

<i>Chemikalie</i>	<i>Firma</i>
Agar	Roth
Agarose	Roth bzw. FMC Bioproducts
Bromphenolblau	Serva
Calciumhypochlorit	Fluka
Confidor	Bayer
Heringssperma-DNA	Gibco BRL
DNA-Längenstandard	MBBL
EDTA	Serva
Ethidiumbromid	Serva
Ficoll	Pharmacia
myo-Inositol	Sigma
MOPS	Serva
NaOH	Roth
Nukleotidtriphosphate	Boehringer
³² P-Nukleotidtriphosphate	Amersham
Phenol	Roth
Röntgenfilmentwickler	Kodak
Röntgenfilmfixierer	Kodak
SDS	Serva
Tris	Roth
Triton X-100	Serva
Tween 20	Serva
Xylencyanol	Serva

Enzyme und Kits

Klenow-Polymerase	Boehringer
Lysozym	Merck
Prime It II Labeling-Kit	Stratagene
Restriktionsenzyme	Pharmacia bzw. Boehringer
RNase	Boehringer

Verbrauchsmaterialien

Hybond N Nylonmembran	Amersham
3MM-Papier	Whatman
Nick-Säulen (Sephadex G50-Säulen)	Pharmacia
Röntgenfilme X-Omat DS und X-Omat AR	Kodak

2.6 Primer

2.6.1 Primer für Screening nach Insertionsmutanten

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der *TAIR Database* (<http://www.arabidopsis.org>), dem Programm *Primerdesigner* (Version 2.0, Educational & Scientific Software) und dem Programm *Primer3* vom Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Massachusetts, USA (http://waldo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_wwww.cgi) ermittelt.

Primername	Sequenz	Orientierung auf BAC (RC = reverse complement)
<u>AtCKX1</u>		
CA1	TCG ACG ATG TCC ACA ATG TGG CCA AG	
CA2	GAA GTC GTA ACC TGT TCT GAG AAG CG	
CA2inner	TTT CTT CAG TGT TCT TGG CGG GCT TG	
CA3inner	TCC TGC ACG GCA ACC ATT CAT TAT GT	RC
CA3	CCC TTT GCT CTT AGT TTT CTC TCT GC	RC
CA4	AGA ATC GCT AGA GGG TCG TAG GCT TG	RC
1cox13	ACC AAT CTT TGT TCC AAT CAT TCT GTT AG	
1cox88	TCA TTA GTT TCA CTA GAT TTG GAG GGT TA	
1cox1921	CAA ATA CTG CTT CAC GTT GAG GTT TGC TG	RC
1cox2080	TGC GAG TTG GAT GGG AGA TAA TTT TCC TG	RC
<u>AtCKX2</u>		
CB1	AAC CTC ACC CTC TCT ACC GAT CCT TC	
CB2	CTA TGG AGT GTT AGG AGG TTT GGG TC	
CB3	GTT GTG AAA TCA CTG TAG AGC ATC CG	RC
CB4	CGG TTT GTT GGA TAG AGA AGA GCG AG	RC
Cox2-1Wis	CAC CGA ATC ATT TGC AAC CAA ATC AAC TC	
Cox2-2Wis	CGA TGA AGC TGC AGA TAA GGA AAC TGA AT	RC
Cox2-1l	TGC TTC TCA TAA TCT ACT ATT GTG TAG GT	
Cox2-12	ATA TAA CAT CTT CAT CGA TCT CTG GTA TC	RC
<u>AtCKX3</u>		
COX3-1	CTT CGT TCA CAA GTT CGT CTT ATA GC	
COX3-2	AAT AGG TGG TTG TAA ACG TAG ACG CA	
COX3-3	GGT CTA ATT TAT CTG CGG TTT AGT CC	RC
COX3-4	TCT TCC TCG GGT ATA GCG GCA GAC AT	RC
CC1	TCC GTC GAA TCA GCC GCC ACA GAT TT	
CC2	GAT AAG CAA AAT TGG TGG TTG GTC TAA	
CC3	AAC CGT TGC GCA CCA TGT TTA TTT GT	RC
CC4	ATA GCG GCA GAC ATC CGA TCA TTC CA	RC
COX3-1c	CCA CGT CAC CAA AAT CTT CCC TTC CG	
COX3-2c	GAT ACG GAC TAG GTA AAA ATA GGT GG	
COX3-3c	TAT GAA TGG AGG CAG CGG ACA AAG CG	RC
COX3-4c	TAT CGC TTA ACT CCT CCA TTT CCT GC	RC
Cox3-3A	ACA ACC ACC TAT TTT TAC CTA GTC CG	
Cox3-3B	TCT TCT ATT GCT AGA TCG ACC TTT GC	
Cox3-1Wis	GAC CGT GGA ATA TTT ATG CAG AAC CAT TT	
Cox3-2Wis	GTC CAA GAA ACC GGC GTT AAC CCT AAC TC	RC
<u>AtCKX4</u>		
COX4-1	CTC TGC CGC TTC TCA CGA CTT CGG TA	
COX4-2	CAA GGT AAA ACT CAC ACG CCA TAA CC	
COX4-3	GCG AGA CCA TTT CAC CTG CAG ATT TG	RC

2 Material und Methoden

COX4-4	CAT AAA CCC TGG AGC GAA ACC TAG AG	RC
COX4-A	CTC TGC CGC TTC TCA CGA CTT CGG TA	
COX4-B	GTT CTA TGG AGT TTT AGG AGG TTT GG	
COX4-C	AGA AGT CAC TGT AGA GTA TGC GAG AC	RC
COX4-D	GAG GAA CTT CCC ATA GTC CTA AAG AT	RC
COX4-3B	AAC AAA TAG GTG CAA GCG ACC ACA AC	RC
COX4-3C	GTC AAC TCC GAG ATC ATT GGT CAT TG	RC
COX4-1Wis	AGT GTT ATT TAT GAA CCG GCC CAC AGA GT	
COX4-2Wis	TTT GGC TAA GGA CGA GAA CTT TGT ACT AA	RC

AtCOX5

COX5-1WIS	ATA TGA CGT GAT CTT CTC CGG TAC AAC TC	
COX5-2WIS	TTG TTG CAG CAA CGA CCA ACC GAT AAT GA	RC
COX5-I1	GTA TTG TAT TCG AGC TTC AAA GTG TTT AC	
COX5-I2	CAT TAT TAA GTT CAG GTG GAA AAG CTA GA	RC
COX5B	AAT GGT ATA TTG TGA TGA CAG GTG AGA TG	
COX5C	TCC ACA TAT TGT AAA TCC GTT GTA AAG AC	

AtCOX6

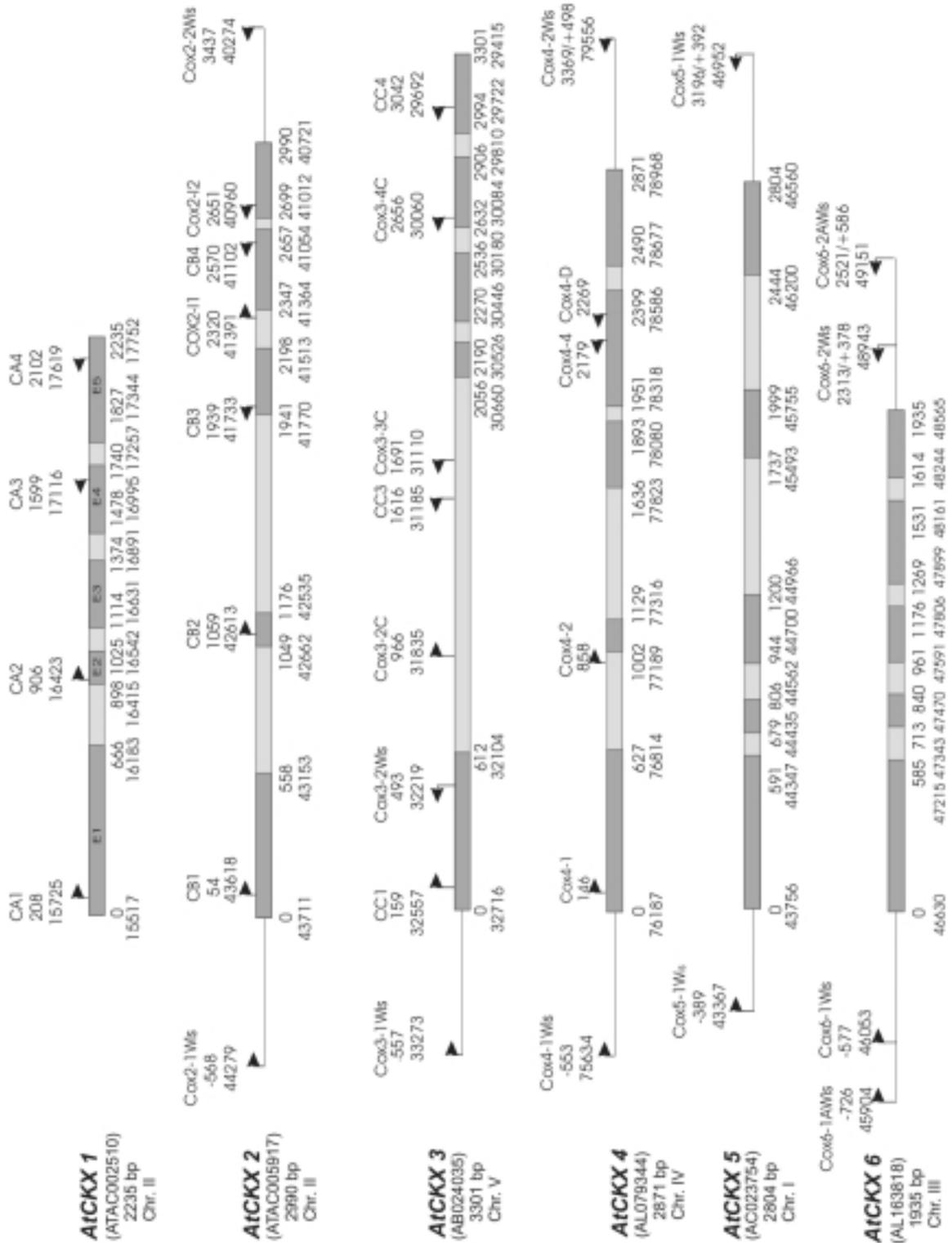
COX6-1WIS	CCA CCA TTC TTT TAC TCT CAC GGA TGA TA	
COX6-2WIS	CCA TCA TTT GCT TGC TTT GTC CAT AGG AG	RC
COX6-1AWIS	GTA ACA GGA AGA CTT ACT CAT TGG TTG CT	
COX6-2AWIS	GCA CAA GAA GAG ATT GAT TAT TCA CCA GA	RC

Transposon

Spm8130/ En8130	GAG CGT CGG TCC CCA CAC TTC TAT AC
Spm226c En205	GCA CGA CGG CTG TAG AAT AGG ATT GG AGA AGC ACG ACG GCT GTA GAA TAG GA

T-DNA

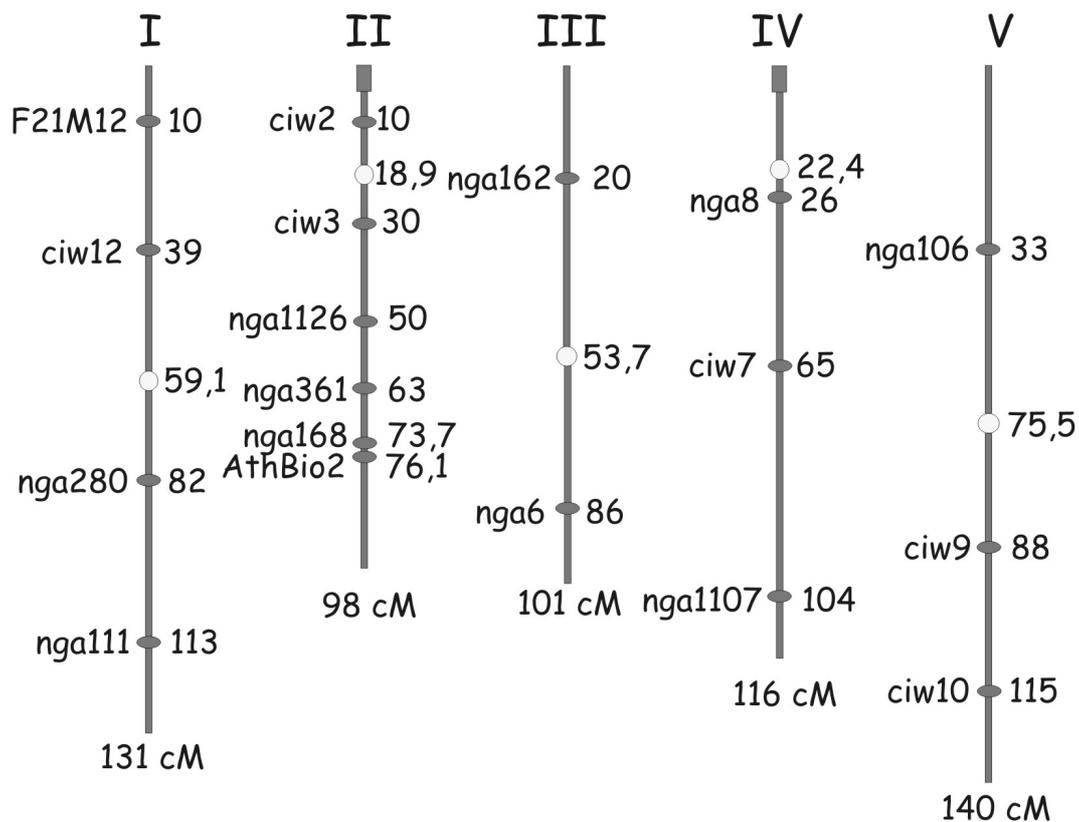
JL-202	CAT TTT ATA ATA ACG CTG CGG ACA TCT AC
XR-2	TGG GAA AAC CTG GCG TTA CCC AAC TTA AT



Grafik 1: Lage der am häufigsten verwendeten Primer auf den Genen *AtCKX1-AtCKX6*. Die Lokalisation der restlichen Primer ist durch Datenbanksuche (*BLAST Search*) mit den Primersequenzen (siehe 6. Primer) in der *TAIR Database* (<http://www.arabidopsis.org>) bestimmbar.

2.6.2 Primer für Mapping

Die für das Mapping verwendeten Primer wurden größtenteils aus Lukowitz et al. (2000) entnommen. Die Sequenzen und Lage auf den Chromosomen der Primer nga361, AthBio2, nga8 und nga106 wurden von der TAIR Database (Stanford, USA) entnommen (<http://www.arabidopsis.org/aboutcaps.html>). Die Lage der Marker auf den Chromosomen ist in Grafik 2 beschrieben.



Grafik 2: Lage der verwendeten SSLP Marker auf den Chromosomen von *Arabidopsis thaliana*. Alle Werte sind in Centimorgan (cM) angegeben. Helle Kreise bezeichnen die Centromerregionen. Die Rechtecke am oberen Arm von Chromosom II und IV bezeichnen Regionen mit großer Übereinstimmung der Sequenzabfolge.

2.6.3 Primer zur Bestätigung der Insertionen in den *Atckx*-Linien

2.7 Genproben

Zur Hybridisierung von *Southern blots* der PCR-Produkte der T-DNA und *En1*-Insertionsmutantenscreens wurden folgende Genproben verwendet:

AtCKX1: PCR Produkt von CA1 und CA4

AtCKX2: PCR Produkt von CB1 und CB4

AtCKX3: PCR Produkt von Cox3-1C und cox3-4C

AtCKX4: PCR Produkt von COX4-A und COX4-D

AtCKX5: PCR Produkt von COX5-1WIS und COX5-2WIS

AtCKX6: PCR Produkt von COX6-1WIS und COX6-2WIS

2.8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
B	Blatt
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
°C	Grad Celsius
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CIA	Chloroform / Isoamylalkohol (24:1; v/v)
cpm	Impulse pro Minute
d	Tag(e)
dag	Tage nach Keimung
dac	Tage nach Subkultivierung (auf KS-Medium)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethyl-Methanosulfonsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa	Firma
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GUS	β-Glukuronidase
H	Hypokotyl
h	Stunde
Hyg	Hygromycin
<i>ipt</i>	Isopentenyltransferase-Gen
IPT	Isopentenyltransferase
Kan	Kanamycin
KS-Medium	Kallus-Screening Medium (je 0,05 mg/l 2iP und NAA)
l	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie

Lsg.	Lösung
M	Molar
M	Meristem
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektroskopie
MS-Medium	Murashige und Skoog-Medium
OD	Optische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Saline
T-DNA	Transfer-DNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Enzymeinheit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
W	Wurzel
wag	Wochen nach Keimung
W/H	Übergangsbereich zwischen Wurzel und Hypokotyl
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht / Volumen
X-GlcA	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide

2.8.1 Abkürzungen für Cytokinine

2iP	$N^6-(\Delta^2 \text{ Isopentenyl})\text{adenin}$
DZ	Dihydrozeatin
DZ9G	Dihydrozeatin-N9-Glukosid
DZOG	Dihydrozeatin-O-Glukosid
DZR	Dihydrozeatinribosid
DZROG	Dihydrozeatinribosid-O-Glukosid
DZRP	Dihydrozeatinribosid-5'-Monophosphat
iP	$N^6-(\Delta^2 \text{ Isopentenyl})\text{adenin}$
iP7G	$N^6-(\Delta^2 \text{ Isopentenyl})\text{adenin-N7-Glukosid}$
iP9G	$N^6-(\Delta^2 \text{ Isopentenyl})\text{adenin-N9-Glukosid}$
iPR	$N^6-(\Delta^2 \text{ Isopentenyl})\text{adeninribosid}$
iPRP	$N^6-(\Delta^2 \text{ Isopentenyl})\text{adeninribosid-5'-Monophosphat}$

Z	Zeatin
ZNG	Zeatin-N-Glukosid
Z7G	Zeatin-N7-Glukosid
Z9G	Zeatin-N9-Glukosid
ZOG	Zeatin-O-Glukosid
ZR	Zeatinribosid
ZROG	Zeatinribosid-O-Glukosid
ZRP	Zeatinribosid-5'-Monophosphat

2.8.2 Abkürzungen für Auxine

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
IAA	Indolessigsäure
IBA	Indol-3-buttersäure
NAA	Naphtylessigsäure

3 Ergebnisteil A: Charakterisierung und Identifizierung der *tumor prone* Mutanten

3.1 Vorversuche

Die tumorbildenden Mutanten von Frank (1999) und Rupp et al. (2000) waren auf hormonfreiem Medium gescreent worden. Zelldifferenzierungsmutanten, die hormonsensitiv sind, d.h. erst durch eine Änderung der exogenen Hormonkonzentration von Cytokinin und Auxin Tumore bilden, wurden mit diesem Screen unter Umständen nicht entdeckt. Da Cytokinine und Auxine an Zellteilungs- und Zelldifferenzierungsvorgängen beteiligt sind (Skoog und Miller 1957, John et al. 1993, Jacobs 1995, Zhang et al. 1996), war es von Interesse, mit Hilfe solcher hormonsensitiver Mutanten Einblick in die Zusammenhänge zwischen Zellteilung und Pflanzenhormonen zu erhalten. Deshalb wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein neuer Screen geplant, der hormonsensitive kallusbildende Mutanten aufspüren sollte.

Vorversuche sollten klären, ob mit diesem Konzept ein praktikabler Screen zu etablieren ist.

1. Zur Identifizierung unspezifischer Kallus- und Organbildung wurden mit dem Skalpell Pflanzenteile von WT Pflanzen abgetrennt und auf hormonfreiem Medium kultiviert. Das Zerschneiden der Pflanze sollte dabei eine Dedifferenzierung an Wundflächen auslösen. Desweiteren wurde verhindert, dass ein entstehender Kallus durch andere Organe kontrolliert und in seinem Wachstum gehemmt wird.
2. Es wurden Hormonmatrizen mit Kombinationen von Cytokininen und Auxinen erstellt, um eine geeignete Kombination und Konzentration von Hormonen herauszufinden.
3. Bekannte tumorbildende Mutanten wurden anschließend unter den ermittelten Screeningbedingungen getestet und der entstandene Phänotyp beobachtet. Ein deutlich auftretender Phänotyp unter Screeningbedingungen war ein Hinweis auf die Potenz des Screens, tumorbildende Mutanten zu identifizieren.

3.1.1 Initiierung von Wundkallus an WT Pflanzen

Hundert WT Pflanzen wurden 10 Tage nach Keimung in Wurzel, Wurzel/Hypokotyl-Übergang, Hypokotyl, Blätter und blattloses Meristem zerteilt. Die Explantate wurden 14 und 28 Tage nachdem sie auf hormonfreiem Medium ausgelegt worden waren analysiert. Nach 14 Tagen wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten sichtbaren Veränderungen an den Explantaten festgestellt.

Tabelle 1: Beschreibung sichtbarer Veränderungen von *Arabidopsis* Explantaten nach 14 Tagen auf hormonfreiem Medium.

Explantat	Veränderung nach 14 Tagen
Wurzel	Ausbildung grüner Verdickungen an den Verwundungsstellen und den Austrittsorten der Seitenwurzeln. Initiierung von neuen Wurzeln.
Wurzel/Hypokotyl-Übergangsbereich	Ausbildung grüner Verdickungen an den Verwundungsstellen und am Übergangsbereich zwischen Wurzel und Hypokotyl. Wurzelbildung am Übergangsbereich zwischen Wurzel und Hypokotyl.
Hypokotyl	Grüne Verdickungen an den Schnittstellen. Vereinzelt Ausbildung einer Wurzel an einer der Schnittstellen.
Blätter	Blätter deren Stielansatz im Agar liegt, bleiben grün. Liegt die Blattoberseite auf dem Agar, werden die Blätter braun und sterben ab.
Meristem	Es bilden sich neue Blätter und Wurzeln aus.

Die Verwundungsstellen von Wurzel und Hypokotyl schwellen an und werden deutlich grüner. Wurzelexplantate initiieren zudem neue Wurzeln, an deren Verzweigungsstellen sich grüne Anschwellungen ausbilden. An Hypokotylexplantaten bilden sich ebenfalls in seltenen Fällen Wurzeln. Die phänotypischen Veränderungen an den Blattexplantaten sind abhängig von der Kontaktstelle zum Medium. Nur wenn die Schnittstelle an den Petiolen ins Nährmedium tauchte, blieb das Blatt vital, andernfalls starb es ab. Das Meristem hingegen hatte nach 14 Tagen schon weitere Blätter und Wurzeln ausgebildet, unabhängig davon, ob Petiolen- oder Hypokotylstumpf das Medium berührten.

Die Besonderheiten der verschiedenen Explantate nach 28-tägiger Kultivierung auf hormonfreiem Medium sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Nach 28 Tagen hatten die Anschwellungen an den Wurzelexplantaten eine unregelmäßige Oberfläche bekommen, wuchsen jedoch, im Gegensatz zu den neuen Wurzeln, nicht weiter.

Die Wurzel/Hypokotyl-Explantate (W/H) zeigten in 63% der Fälle eine Wundkallus- und Wurzelbildung. Nur 14% der Hypokotylexplantate wiesen Veränderungen auf. In 11 von 100 Fällen formten sich Wurzeln. Ein Wundkallus entstand in nur 5 Fällen und nur an einem Hypokotylexplantat trat eine spontane Sprossbildung auf. Nur 5 der abgeschnittenen Blätter wuchsen weiter und blieben grün, während die übrigen abstarben. Aus dem Meristem entwickelte sich wieder eine vollständige Pflanze. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es auf hormonfreiem Medium an keinem der verschiedenen Organexplantate zu einem unkontrollierten Kalluswachstum kam. Das beobachtete Wundkalluswachstum war immer zeitlich begrenzt und in keinem Fall wurde der Kallus größer als 2 mm. Dies legt nahe, dass es sich bei einer Kallusbildung an Explantaten von M2 Pflanzen nicht um falsch positive Phänotypen handelt. Vielmehr ist in Betracht zu ziehen, dass Gene, die an der Kontrolle von

Zellteilungs- oder Zelldifferenzierungsprozessen beteiligt sind, durch Mutation in ihrer Funktion beeinträchtigt sein müssen.

Tabelle 2: Statistik der phänotypischen Veränderungen der WT-Explantate nach 28 Tagen. Die Explantate waren auf hormonfreiem Medium kultiviert worden.

Veränderung am Explantat	Wurzel	W/H	Hypokotyl	Blatt	Meristem
Keine	5	37	86	95	0
Wurzelbildung	0	0	8	0	0
Blatt und Wurzelbildung	0	0	0	0	100
Blattbildung	0	0	1	0	0
Wundkallus	0	0	2	5	0
Wundkallus & Wurzel	95	63	3	0	0
Undifferenziertes Kalluswachstum	0	0	0	0	0

3.1.2 Hormonmatrix

Skoog und Miller (1957) hatten gezeigt, dass eine Veränderung des Verhältnis von Cytokinin und Auxin im Medium bei Tabakkalli die Spross und Wurzelbildung beeinflusst. Eine Erhöhung des Verhältnisses zugunsten von Cytokinin führt zu vermehrter Sprossbildung, eine Verminderung der Cytokininkonzentration im Medium zu Wurzelbildung. Ein ausgewogenes Gleichgewicht der beiden Hormone führt ab einer Wirkkonzentration zu undifferenziertem Kalluswachstum. An *Arabidopsis thaliana* sind diese Effekte noch nicht im Detail untersucht worden. Auswirkungen exogen applizierter Cytokinin- und Auxinkonzentrationen auf *Arabidopsis*-Explantate wurden für verschiedene Gewebe nach Kultivierung auf Medien mit unterschiedlichen Cytokinin/Auxinkonzentrationen untersucht. Insbesondere sollte eine Cytokinin- und Auxinkonzentration gefunden werden, die bei WT Pflanzen noch keine Kallusbildung bewirkt. Nur so konnten falsch positive Kalli (Artefakte) verhindert werden. Es wurden Hormonmatrizen mit Kinetin/2,4D, sowie 2iP/NAA erstellt.

Die verschiedenen Pflanzenteile wurden auf die Hormonmatrix gelegt und nach vierwöchiger Kultivierung untersucht. Für den Versuch wurden je Rasterpunkt auf der Hormonmatrix jeweils 14 Pflanzen bearbeitet. Die Ergebnisse dieser Hormonmatrix sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Es stellte sich heraus, dass es bei einem niedrigen Kinetin/2,4D-Verhältnis zu einer erhöhten Wurzel- und Kallusbildung kam. Kalli und Wurzel waren weiß bis gelb. Ein intermediäres Kinetin/2,4D-Verhältnis führte bei niedriger Konzentration (0,05/0,05) zu einer Kallusbildung ohne Wurzeln. Bei der nächsthöheren Konzentrationsstufe (0,1/0,1) kam es schon zur Ausbildung von Wurzelkalli. Je höher das Kinetin/2,4D Verhältnis, desto stärker war die Grünfärbung der gebildeten Kalli und umso geringer die Wurzelbildung am Kallus. Ein Kinetin/2,4D-Verhältnis von 8:1 führte immer noch zur Wurzelinduktion am Kallus. Bei 2,4D Konzentrationen von 0,5 µg/l und mehr blieben die Kalli gelb und weiss,

unabhängig von der verwendeten Kinetinkonzentration. Mit den verwendeten Konzentrationsverhältnissen von Kinetin und 2,4D gelang es nicht, Sprosse an den Kalli zu induzieren. Selbst eine Erhöhung der Kinetinkonzentration, im Verhältnis zu 2,4D, um den Faktor 20 bewirkte keine Sprossbildung.

Tabelle 3: Ergebnis der 2,4-D/Kinetin Hormonmatrix. Exemplarisch wird nur das Wurzelexplantat beschrieben. Der Tabellenhintergrund gibt die Farbe der jeweiligen Kalli wieder. Abkürzungen: K = Kallus, WK = Wurzelkallus, Farbcode: weiß = keine Kallusbildung, gelb = Kallusfarbe gelb und weiß, hellgrün = Kallus mit weißen, gelben und grünen Zonen, grün = Kallusfarbe grün.

mg/l 2,4D	1	WK	WK	WK	WK	WK	WK
	0,5	WK	WK	WK	WK	WK	WK
	0,25	WK	WK	WK	WK	WK	WK
	0,125	WK	WK	WK	WK	WK	WK
	0,05	K	K	WK	K	K	K
	0	-	K	K	K	K	K
		0	0,05	0,125	0,25	0,5	1
	mg/l Kinetin						

Die dominierende Wirkung von 2,4D und die fehlende Sprossbildung bei einem hohen Cytokinin/Auxin-Verhältnis machten es notwendig, andere Hormone auszuwählen, die geeignete Grundvoraussetzungen für einen Screen bildeten. Deshalb wurde eine weitere Hormonmatrix mit den Hormonen NAA und 2iP erstellt und Pflanzengewebe darauf 4 Wochen kultiviert, um danach phänotypische Veränderungen zu untersuchen. Es wurden Wurzeln, W/H, Hypokotyl und Blätter von WT Pflanzen verwendet. Exemplarisch werden nur die Wurzelexplantate beschrieben. Die W/H-, Hypokotyl- und Blattexplantate zeigten jedoch ähnliche phänotypische Veränderungen.

Keine der gewählten 2iP-Konzentrationen zwischen 0,05 und 1 mg/l führte ohne zusätzliches Auxin im Medium zu einer starken morphologischen Veränderung. Bei einer Konzentration von 1 mg/l bildete sich an den Verwundungsstellen der Wurzel ein kleiner grüner Kallus aus. Im Gegensatz dazu hatte eine NAA-Konzentration von 0,05 mg/l schon eine deutliche Wurzelbildung zur Folge. Höhere NAA-Konzentrationen führten zur Ausbildung von gelblichen Wurzelkalli. Mit zunehmender NAA-Konzentration nahm die Länge der ausgebildeten Wurzeln am Kallus ab. Eine Konzentration von jeweils 0,05 mg/l 2iP und NAA im Medium führte im Vergleich zu Wurzeln auf Kontrollmedium ohne Hormon zu keinen

sichtbaren Unterschieden. Eine Erhöhung der Konzentration eines oder beider Hormone initiierte jedoch die Ausbildung von Kalli oder Organen. Dabei zeigte sich, dass eine Zunahme der NAA-Konzentration bei gleich bleibender 2iP-Konzentration zu einer vermehrten Wurzel- und Kallusbildung führt. Bei einem Anstieg der Cytokininkonzentration bei gleich bleibender NAA-Konzentration kam es hingegen zur Ausbildung von grünen Kalli und Sprossen. Nur bei einer 2iP-Konzentration im Medium, die um den Faktor 5-10 höher als die NAA-Konzentration lag, kam es zur Sprossbildung (Abbildung 1). Da die Hormonkonzentration von jeweils 0,05 mg/l 2iP und NAA im MS-Medium noch keine phänotypischen Veränderungen bewirkte, eine Erhöhung einer oder beider Hormone aber sehr wohl, wurde diese Konzentration im Kallusscreeningmedium (= KS-Medium) zur Durchführung des Kallusscreens verwendet.

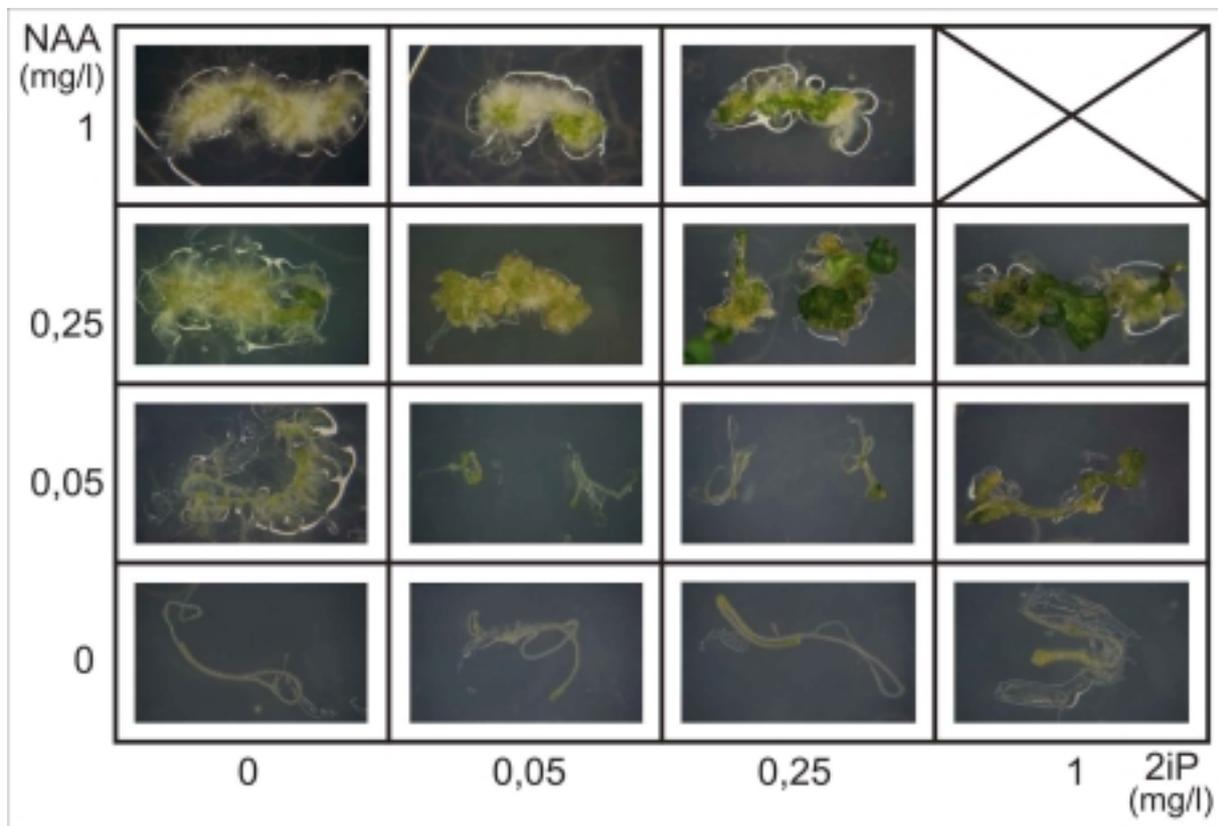


Abbildung 1: 2iP/NAA-Hormonmatrix von Wurzelexplantaten, nach vierwöchiger Kultivierung auf verschiedenen Hormonmedien.

3.1.3 Versuche mit bekannten Mutanten

Um zu testen, ob beim Kallusscreening kallusbildende Mutanten gefunden werden können, wurden bekannte Mutanten mit spontaner Kallusbildung oder vermehrter Sprossbildung den Bedingungen des Kallusscreens unterzogen. (*amp1*, Chaudhury et al. 1993; *tsd1* und *tsd2*, Frank 1999; *sur1*, Boerjan et al. 1995, Celenza et al. 1995, King et al. 1995, Lehman et al. 1996).

Tabelle 4: Beschreibungen der phänotypischen Veränderungen von *amp1*, *sur1*, *tsd1* und *tsd2* nach Kultivierung von Explantaten auf KS-Medium mit je 0,05 mg/l 2iP und NAA.

Mutante	Phänotyp der Pflanze	Phänotyp unter Screeningbedingungen
<i>amp1</i>	Vermehrte Seitensprossbildung. Häufig Ausbildung von drei Keimblättern. Zehnfach erhöhte endogene Cytokininkonzentration (Chaudhury et al. 1993).	Zeigt schon nach 5-7 Tagen Blatt- und Sprossbildung an Wurzel- und W/H- Explantaten.
<i>sur1/rtv</i>	7 dag: Kallusbildung an der Basis des Hypokotyls. 14 dag: Starke Wurzelbildung am Kallus. Der Kallus breitet sich akropetal aus. 28 dag: Brauner Kallus mit Wurzeln wächst weiter (Boerjan et al 1995, King et al. 1995).	Starke Wurzelkallusbildung an Wurzel und W/H-Explantaten schon nach 7 Tagen.
<i>tsd1</i>	5 dag: Nur wenige Millimeter großer Keimling. 14 dag: Kotyledonen und Wurzel sterben ab und das Sprossmeristem bildet sich zu einem grünen Kallus mit blattartigen Strukturen um (Frank 1999).	Grüner Kallus mit kleinen Blättern bildet sich nach 10 Tagen am Meristem aus. An den geschnittenen Kotyledonen formen sich auch Kalli, die jedoch nach 2-3 Tagen gelb werden und absterben. Wurzelexplantate zeigten keine Veränderung auf KS-Medium.
<i>tsd2</i>	5 dag: Nur wenige Millimeter großer Keimling. 14 dag: Sichtbare Dedifferenzierung des Sprossmeristems mit Ausbildung grüner blattartiger Strukturen (Frank 1999).	Grüner Kallus mit blattartigen Strukturen bildet sich nach 10 Tagen am Meristem aus. Blatt- und Wurzelexplantate zeigten keine Veränderung durch Hormonbehandlung.

Bei allen getesteten Mutanten war es schwer, die homozygoten Mutanten in die verschiedenen Explantate zu zerschneiden. Insbesondere *tsd1*, *tsd2* und *sur1/rtv* zeigten ein gestauchtes Wachstum schon kurz nach der Keimung. Deshalb wurden die Mutanten nur in Wurzel und W/H zerteilt und die Blätter abgeschnitten. Die *amp1* Explantate regenerierten alle innerhalb einer Woche neue Sprosse, was bei WT nur an einem einzigen Hypokotylexplantat (von 600 Organexplantaten) beobachtet worden war. Unter Screeningbedingungen waren *tsd2* vor allem anhand des veränderten Meristemexplantats zu erkennen, denn es bildete sich ein deutlicher, immer weiter wachsender Kallus aus. Wurzel- und W/H-Explantate waren nicht so auffällig verändert, da sie nicht stark weiter wuchsen. *sur1* Wurzel und W/H Explantate bildeten einen mit wenigen Millimetern langen Wurzeln bedeckten Kallus aus, der sein Wachstum nicht einstellte und nach 4 Wochen eine Ausdehnung in Länge und Breite von bis zu 1,5 cm erreichte. Die Ergebnisse zeigen, dass kallusbildende Mutanten mit dem ausgearbeiteten Kallusscreen identifiziert werden können.

3.2 Beschreibung des Screens

3.2.1 Details des Screens

Als Mutagen wurde Ethyl-Methanosulfonsäure (EMS) verwendet, die Punktmutationen auslöst. Der Vorteil von EMS ist die hohe Mutagenität, wodurch eine Sättigungsmutagenese schon in einer geringen Anzahl von Samen erreicht werden kann. Die molekularen Grundlagen der Mutagenese sind gut untersucht. So wird das Sauerstoffatom (O6) im Guanin durch EMS bevorzugt ethyliert, was nach der Replikation zu einem GC/AT Austausch führt (Vizier et al. 1996). Die im Kallusscreen verwendeten M2 Mutanteneinzellinien waren von Frank (1999) erzeugt und auf die Effizienz der Samenmutagenese untersucht worden. Frank (1999) errechnete für den von ihm mutagenisierten Samenlinien nach Auszählung von embryoletalen Samen und *albino* Mutanten, dass 1500-3000 Einzellinien genügen, um mehr als ein Allel einer Mutante zu finden. Für den Kallusscreen wurden insgesamt 1400 M2 Linien verwendet. Davon waren 900 bis dahin ungetestete Linien und 500 schon zuvor für den Screen zur Auffindung von *trd* und *tsd* Mutanten verwendete Linien (Frank 1999). In Abbildung 2 wird die Vorgehensweise beim Kallusscreen ausgeführt. M2 Samen von EMS-mutagenisierten Samen keimten auf hormonfreiem Medium und wuchsen 10 Tage. Dann wurden die Pflanzen in Wurzel, W/H (= Wurzel/Hypokotyl-Übergang), Hypokotyl, Blätter, und Meristem zerteilt, vier Wochen auf KS-Medium (= Kallusscreening-Medium) kultiviert und daraufhin auf Dedifferenzierungsphänotypen untersucht.

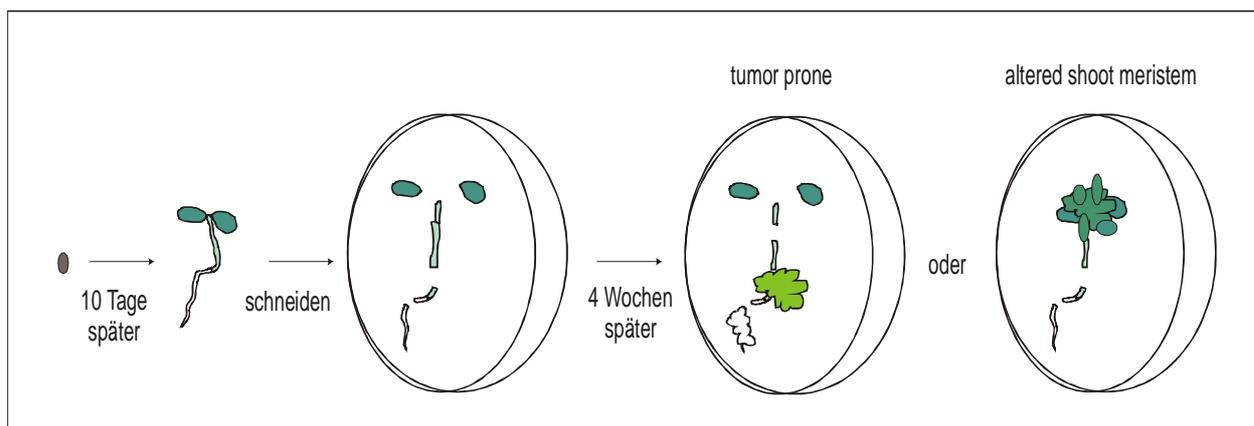


Abbildung 2: Vorgehensweise beim Kallusscreen. EMS-mutagenisierte M2 Samen keimten auf hormonfreiem Medium und wuchsen 10 Tage. Dann wurden die Pflanzen in Wurzel, W/H, Hypokotyl, Blätter und Meristem zerteilt und vier Wochen auf KS-Medium kultiviert, bevor sie auf Dedifferenzierungsphänotypen untersucht wurden. Die letzten zwei Schalen beschreiben schematisch die beobachteten *tup* und *asm* Phänotypen.

3.2.2 Klassifizierung der Mutantenlinien

Die gefundenen Mutanten wurden in zwei phänotypische Klassen eingeteilt.

1. Die fünf Mutanten der ersten Klasse werden als *tumor prone (tup1-tup5)* bezeichnet. Ihr charakteristisches Merkmal ist eine Tendenz zur Tumorbildung in differenzierten Geweben. Die Mutanten *tup1*, *tup2* und *tup4* zeigen *in vitro* auf hormonfreiem Medium keinen auffälligen Phänotyp. Werden diese Pflanzen verwundet oder Gewebe von ihnen auf Medien mit geringen Auxin- und Cytokininkonzentrationen (KS-Medium) gelegt, so dedifferenziert das Gewebe (erkennbar als Kallusbildung). Die Mutanten *tup3* und *tup5* zeigen bereits ohne exogene Anwesenheit der genannten Hormone eine Tendenz zur Dedifferenzierung mancher Gewebe, insbesondere am Wurzel/Hypokotyl-Übergang. Auf niedrigen, beim Wildtyp unwirksamen Hormonkonzentrationen zeigen isolierte Organe *in vitro* Kallusbildung, z. T. in Verbindung mit nachfolgender erneuter Differenzierung, z.B. Sproß- oder Wurzelinduktion. Beispiele für diese Mutantenklasse werden in der Abbildung 2 schematisch dargestellt.

2. Mutanten, die nach der Keimung kein normal organisiertes Sproßmeristem ausbilden, sondern stattdessen eine vermehrte Blattbildung aufweisen oder eine kallusartige grüne Struktur mit nur gering entwickelten Blättern entwickeln, gehören zur zweiten Mutantenklasse *altered shoot meristem (asm1-asm4)*; Abbildung 2, Abbildung 42). Diese Mutanten ähneln den von Frank (1999) beschriebenen *tumorous shoot development (tsd)* Mutanten, weshalb sie im Rahmen dieser Arbeit nur grob charakterisiert wurden und der Schwerpunkt der Charakterisierung auf der neuen Mutantenklasse der *tup* Mutanten gelegt wurde.

3.3 Genetische Charakterisierung der *tup* Mutanten

3.3.1 Segregationsanalyse

Die isolierten Einzellinien *tup1-tup5* enthielten neben der *tup* Mutation zusätzliche Mutationen im genetischen Hintergrund, da die Mutageneseeffizienz bei ca. 10-20 Mutationen pro Linie lag (Frank 1999). Um die Mutationen im genetischen Hintergrund zu verringern, wurden die *tup* Linien mit dem Ökotyp (Col-1 *gl1*) rückgekreuzt, in dem die Mutationen induziert worden waren. Nach dieser Rückkreuzung wurde von den resultierenden Einzellinien die Segregation des *tup* Phänotyps bestimmt. Zur Anwendung kam der χ^2 -Test für die Hypothese eines monogenen rezessiven Erbgangs, d.h. eines Segregationsverhältnisses von 1:3. Dabei wurde für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 und einem Freiheitsgrad ein kritischer χ^2 -Wert von 3,84 berechnet (Spiegel und Stevens 1998). Da die χ^2 -Werte bei den *tup1-tup5* Linien unter diesem kritischen Wert (Tabelle 5) lagen, ist davon auszugehen, dass es sich bei *tup1-tup5* um monogene rezessive Mutationen handelt.

Tabelle 5: Segregationsdaten der Mutantenlinien *tup1-tup5*.

Nach einmaligem Rückkreuzen mit Wildtyppflanzen wurden die Nachkommen von je 8 heterozygoten Pflanzen mit Hilfe des Kallusscreens auf das Auftreten der *tup* Phänotypen hin untersucht. Die χ^2 -Werte wurden für eine Segregationsverhältnis von 1:3 (monogener rezessiver Erbgang) ermittelt. Der kritische χ^2 -Wert beträgt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 und einem Freiheitsgrad $\chi^2=3,84$.

Mutante	Gesamtzahl aller Nachkommen	Anzahl der Nachkommen mit <i>tup</i> Phänotyp	Segregationsverhältnis	χ^2 -Wert 1:3 - Hypothese
<i>tup1</i>	189	58	1:2,3	3,26
<i>tup2</i>	189	45	1:3,2	0,14
<i>tup3</i>	201	47	1:3,2	0,28
<i>tup4</i>	210	60	1:2,5	1,42
<i>tup5</i>	140	28	1:4	1,86

3.3.2 Komplementationsanalyse

Ähnliche phänotypische Merkmale wie *tup5* weist *superroot2* (*sur2*) auf. Sowohl *tup5* als auch *sur2* Pflanzen bilden im Bereich des Hypokotyls 10 Tage nach Keimung vermehrt Adventivwurzeln. Außerdem werden an Hypokotylexplantaten von *sur2* auf 5 μ M BA Kalli und Wurzeln geformt (Delarue et al 1998). An Hypokotylexplantaten von *tup5* entstehen nach Subkultivierung auf KS-Medium Kalli. Deshalb war eine Komplementationsanalyse

erforderlich, um auszuschließen, dass *tup5* und *sur2* allelisch sind. Zur Komplementationsanalyse wurden 7 heterozygote *tup5* Pflanzen mit homozygoten *sur2* Pflanzen gekreuzt. In der F1-Generation der *tup5* Elternpflanzen konnte nachträglich anhand des segregierenden *tup5* Phänotyps nachgewiesen werden, dass die *tup5* Elternpflanzen heterozygot waren. Jeweils 20 Nachkommen dieser *tup5* x *sur2*-Kreuzungen wurden auf *tup5* bzw. *sur2* Phänotypen untersucht. Es konnte in keinem Fall in der F1-Generation dieser Kreuzungen ein Phänotyp festgestellt werden. Die erfolgreiche Komplementation zeigte, dass *sur2* und *tup5* nicht allelisch sind.

Für *tup1-tup3* wurden die einzelnen *tup* Loci anstelle von Komplementationsanalysen zunächst grob kartiert (siehe nächsten Abschnitt: Grobkartierung der *tup* Loci). Nur Mutanten mit ähnlichem Phänotyp und gleicher Kartierungsposition wie die einzelnen *tup*-Linien kommen für eine nachfolgende Komplementationsanalyse in Frage. Zwar ersetzt die Grobkartierung nicht die Komplementationsanalyse, sie grenzt aber die Anzahl der in Frage kommenden Mutanten auf diejenigen ein, die mit gleichen Markern gekoppelt sind.

3.3.3 Grobkartierung der *tup* Loci

Mittlerweile stehen neben klassischen genetischen Markern auch viele molekulare Marker zur positionellen Klonierung eines mutierten Locus zur Verfügung. Die Position der Marker ist durch genetische, sowie z.T. physische Karten gut beschrieben (z.B. TAIR Database, <http://www.arabidopsis.org>). Ein Markerlocus zeigt bei unterschiedlichen Ökotypen Sequenzpolymorphismen. Dies können zum Beispiel Mikrosatelliten (SSLP) (Bell und Ecker, 1994) oder Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (CAPS und RFLP) (Konieczny und Ausubel, 1993) sein. Es wurden vornehmlich SSLP-Marker zur Grobkartierung verwendet, da sie es erlauben, mittels PCR mit geringen Mengen an DNA zu arbeiten.

Für die Grobkartierung wurden heterozygote *tup1*, *tup2* und *tup3* Linien mit Wildtyppflanzen des Ökotyps Landsberg *erecta* (*Ler*) gekreuzt. Nach einer Selbstung in der F1-Generation konnten dann homozygote *tup* Pflanzen in der F2-Generation auf die Kosegregation molekularer Marker hin untersucht werden. Zur Bestimmung, welche Marker mit dem Phänotyp gekoppelt sind, wurden zwei Untersuchungen angestellt.

Zum einen wurde mit Hilfe der „*bulk segregant analysis*“ (Lukowitz et al., 2000) eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Dabei wurden 50 verschiedene DNA Proben homozygoter *tup* Pflanzen der F2 Generation gemischt und dann PCR Amplifikate mit Markerprimern aller 5 Chromosomen erstellt. Sind Marker und mutiertes Gen ungekoppelt, werden die Polymorphismen beider Markerbanden amplifiziert. Besteht eine Kopplung, dann gibt es mehr Templates von Col-1 *g1* als von *Ler*, da die Mutation im Col-1 *g1*-Hintergrund vorliegt. Bei geeignetem PCR Protokoll entsteht dann nur das Col-1 *g1* Amplifikat. Ein Beispiel dieser Analyse ist in Abbildung 3 gezeigt.

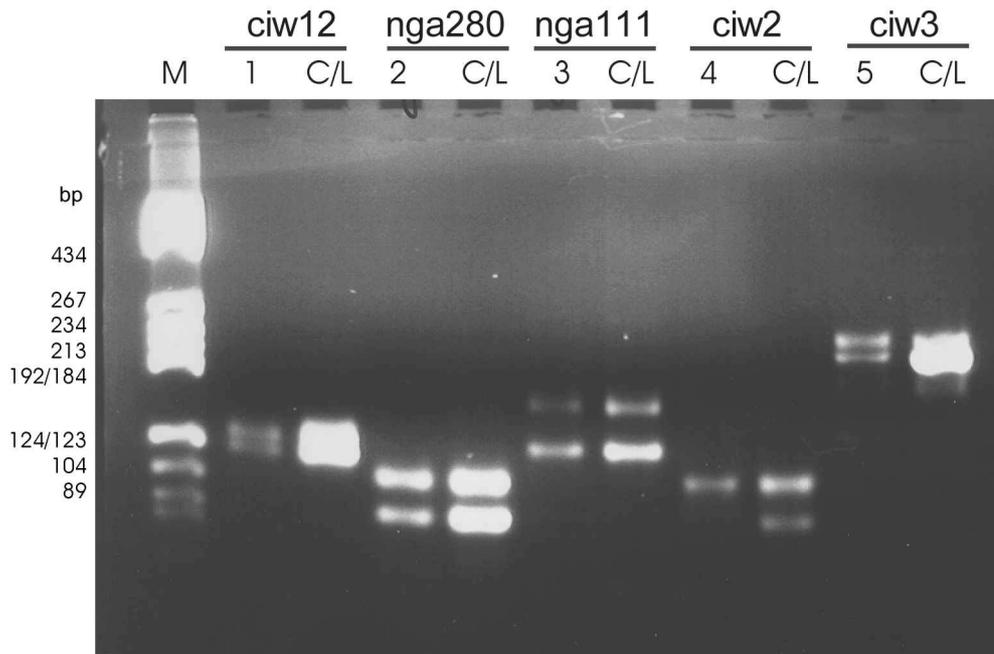


Abbildung 3: Ausschnitt der *bulk segregant analysis* von *tup1* mit Markern von Chr.I (*ciw12*, *nga280* und *nga111*) und Chr.II (*ciw2* und *ciw3*) (Lukowitz et al., 2000). Marker *ciw2* zeigt eine deutliche Kopplung zu *tup1*-Locus, da die *Ler*-Bande gar nicht vorhanden ist. M = Längenmarker pBR322 *Hae*III, 1-5 = PCR Produkte amplifiziert aus einem DNA-Gemisch von 40 homozygoten *tup1* Pflanzen der F2-Generation der Kartierungskreuzung mit *Ler*. Verwendete Markerprimer stehen jeweils über den Zahlen 1-5. C/L = PCR Produkte amplifiziert aus einem Gemisch von Col-1 *gl1*- und *Ler*-DNA mit den jeweiligen Markerprimern.

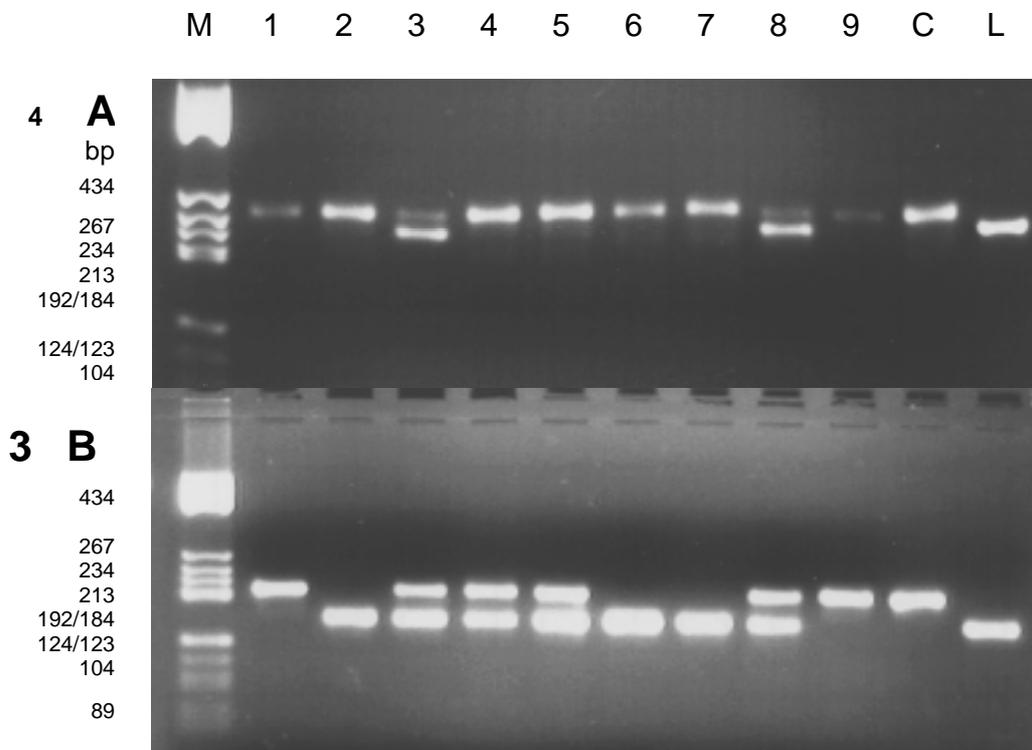


Abbildung 4: PCR amplifizierte SSLPs mit dem an *tup1* Locus gekoppelten und ungekoppelten Markern. **A:** Gekoppelter Marker *ciw2*, **B:** Ungekoppelter Marker F21M12 (Lukowitz et al., 2000). M = Längenmarker pBR322 *Hae*III, 1-9 = PCR Produkte von 9 DNA Proben unterschiedlicher homozygoter F2 Pflanzen der Kartierungskreuzung *tup1* (im Ökotyp Col-1 *gl1*) mit Pflanzen vom *Ler* Ökotyp, C = DNA Kontrolle von Ökotyp Col-1 *gl1*, L = DNA Kontrolle von *Ler* Ökotyp.

Zur genaueren Bestimmung des genetischen Abstands wurden die DNA-Proben einzeln als Templates für das PCR mit den Markerprimern der ermittelten gekoppelten Marker eingesetzt, und danach die Rekombinationshäufigkeit bestimmt (Abbildung 5). Die Kartierungsdaten sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Kosambi-Funktion (Kalanditis et al. 2000) diente der Berechnung der genetischen Abstände zu den einzelnen Markern.

TUP1 liegt demnach im oberen Bereich des unteren Arms von Chromosom II, wahrscheinlich in der Nähe des Centromers. Es wird von den beiden Markern *ciw2* und *ciw3* begrenzt. Der Abstand zu Marker *ciw3* beträgt 11,1 cM, der zu Marker *ciw2* 15,2 cM. *TUP2* kartiert auf dem unteren Arm von Chromosom I. Der nächstgelegene Marker ist *nga111* mit einem Abstand von 27,5 cM. Mit keinem der anderen zur Anwendung gekommenen Marker ergab sich eine stärkere Kopplung. *TUP3* konnte auf dem oberen Arm von Chromosom II lokalisiert werden. Der Abstand zu Marker *ciw2* beträgt 15,7 cM. In Abbildung 5 sind die Loci von *TUP1*, *TUP2* und *TUP3* auf den Chromosomen graphisch dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht der Kartierungspositionen der *TUP*-Loci

Locus	Kartierungsposition	Verwendete Marker und deren Segregation ¹	Nächstgelegener Marker ²
<i>TUP1</i>	Chr. II	<i>ciw2</i> : 25 : 6 : 2 <i>ciw3</i> : 28 : 8 : 0 <i>nga168</i> : 11 : 6 : 2	<i>ciw3</i> (11,1 cM)
<i>TUP2</i>	Chr. I	F12M21: 0 : 6 : 10 <i>nga280</i> : 8 : 7 : 1 <i>nga111</i> : 28 : 13 : 7	<i>nga111</i> (27,5cM)
<i>TUP3</i>	Chr. II	<i>ciw2</i> : 26 : 7 : 2 <i>ciw3</i> : 12 : 3 : 5 <i>nga168</i> : 9 : 19 : 4	<i>ciw2</i> (15,7 cM)

¹ Die Segregationsdaten der einzelnen Marker sind in der Reihenfolge Col/Col:Col/Ler:Ler/Ler aufgelistet.

² In Klammern ist die mittels Kosambi-Funktion errechnete Entfernung angegeben (Kalanditis et al. 2000). Die Lage der Marker bezieht sich auf die RI-Karte (<http://www.arabidopsis.org>), Stand 19. Juni 2001).

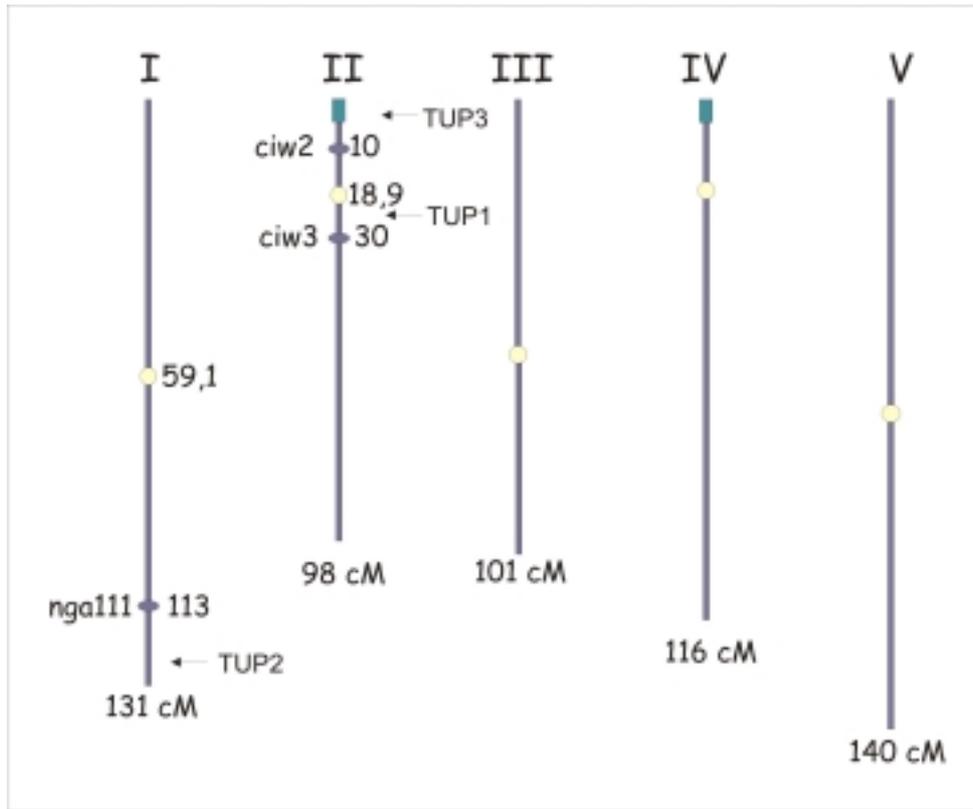


Abbildung 5: Kartierung der *TUP*-Loci auf den Chromosomen von *Arabidopsis thaliana*. Die nächstgelegenen Marker und die Centromere (als Kreise dargestellt) sind mit ihrer Kartierungsposition in Centimorgan angegeben. Rechtecke an den oberen Armen der Chromosomen II und IV bezeichnen Bereiche mit hoher Homologie.

3.4 Phänotypische Beschreibung der *tup* Mutanten

Die *tup* Mutanten zeichnen sich durch Kallusbildung an Wurzel- oder Hypokotylexplantaten aus. Dabei bilden sich die Kalli (mit Ausnahme von *tup3* und *tup5*) nur aus, wenn die Explantate auf KS-Medium (MS Medium mit jeweils 50 µg/l NAA und 2iP) kultiviert werden. Im folgenden Ergebnisteil werden zuerst die Kallus-Phänotypen beschrieben, die zum Auffinden der *tup* Mutanten geführt haben und dann, in vielen Details, der Pflanzenphänotyp der einzelnen Mutanten.

3.4.1 Phänotypische Beschreibung der *tup1* Mutante

Die *tup1* Mutanten zeigen sowohl bei Kallusbildung an Wurzel- und Hypokotylexplantaten *in vitro*, als auch auf Erde einen deutlichen und schnell sichtbaren Phänotyp. *In vitro* bilden sich die Kalli schon nach wenigen Tagen an den Explantaten aus. Auf Erde hat *tup1* im Vergleich zu WT einen kleineren Habitus und kleinere, dunkelgrüne Blätter.

3.4.1.1 Kallusbildung *in vitro*

98% aller *tup1* Wurzelexplantate bildeten runde, grünliche Kalli (Abbildung 7) an den Verwundungsflächen aus, wenn sie auf KS-Medium ausgelegt worden waren. 82% der Wurzelexplantate bildeten noch an weiteren Stellen Kalli aus. Die Kalli traten frühestens nach 7 Tagen an Wurzel- oder Hypokotylexplantaten auf, wobei annähernd 90% der Explantate zwei oder mehr Kalli ausbildeten. Die nachfolgende Abbildung 6 verdeutlicht die Orte der Kallusbildung. In 78% der Fälle entstanden Kalli an beiden Enden des Explantats. Bei der Auszählung der Orte der Kallusbildung wurde nicht zwischen apikaler und basaler Seite der Explantate unterschieden.

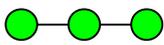
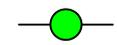
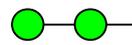
Ort der Kallusbildung an Wurzelexplantaten					
Anzahl	45	3	1	6	8

Abbildung 6: Statistik über Häufigkeit des Entstehungsortes der Kalli an Wurzelstücken von *tup1* Mutanten. Dabei wurde die Orientierung der Wurzelexplantate (apikal oder basal) nicht berücksichtigt. Insgesamt wurden 63 homozygote *tup1*-Pflanzen untersucht.

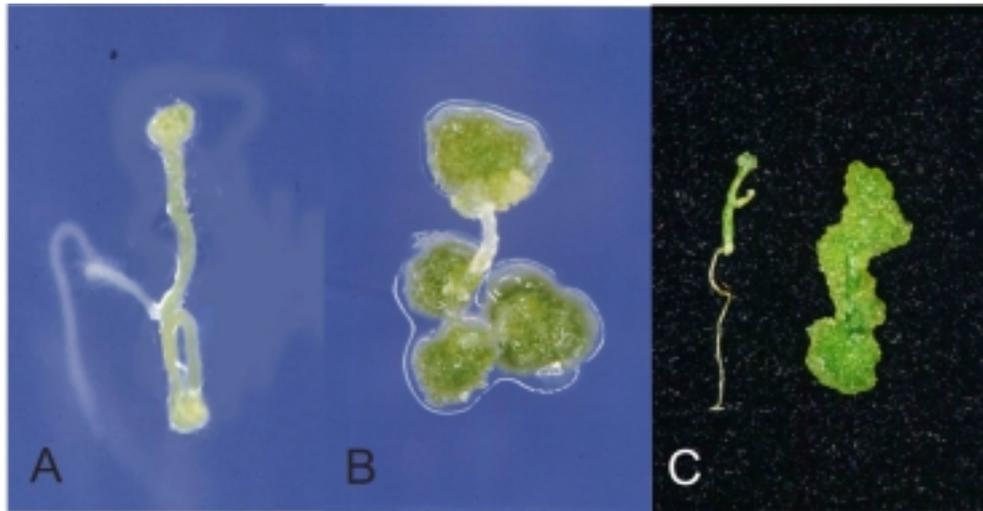


Abbildung 7: Kallusbildung an WT und *tup1* Wurzelexplantaten. **A:** WT Kontrolle **B:** Kallusbildung auf KS-Medium nach 21 Tagen. **C:** Kallusbildung 28 Tage nach Kultivierung auf KS-Medium.

Ohne Cytokinin und Auxin im Medium zeigte sich der Phänotyp an den Explantaten in nur 7% der Fälle (3 von 43 homozygoten Pflanzen). Im Vergleich dazu hatten WT-Explantate keine Kalli ausgebildet (Abbildung 1).

Der Kallus wächst ca. 3-4 Wochen weiter und stirbt dann ab, wenn er nicht auf neues Medium umgesetzt wird. Dann kann er jedoch immer weiter propagiert werden. Die Kalli sind noch omnipotent, denn sporadisch können sich Sprosse aus den Kalli formieren und zu Pflanzen heranwachsen. Dies geschieht jedoch frühestens 5 Wochen nach Kallusbildung. Die Kalli sind von harter Konsistenz, lassen sich aber mit dem Skalpell zerteilen. An der Oberfläche der Kalli lösen sich die Zellen leicht ab. (Abbildung 38G). Die Kalli zeigen zu Beginn ein schnelles Wachstum, dann jedoch nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich ab. Der genaue Wachstumsverlauf in Abhängigkeit verschiedener 2iP/NAA-Konzentrationen im Medium wurde anhand des Gewichtes der Explantate bestimmt (Abbildung 38).

3.4.1.2 Pflanzenphänotyp von *tup1*

In vitro unterscheiden sich *tup1* Pflanzen von WT Pflanzen durch verringertes und verändertes Wurzelwachstum (Abbildung 9, Abbildung 30), jedoch nicht anhand des Sprossphänotyps. Wächst *tup1* auf Erde, kann man die homozygoten *tup1*-Pflanzen schon nach ca. 2 Wochen anhand ihres verringerten Wuchses und dem dunkleren Grün der Blätter leicht unterscheiden. (Abbildung 8A-E). Die Pflanzen sind auch anfälliger gegenüber abiotischen Stressfaktoren, wie erhöhte Lichtmenge und Trockenheit und Feuchte. Sie bilden dann innerhalb von 2-3 Tagen Anthocyane in den Blattadern, bei anhaltendem Stress im ganzen Blatt. Die Blätter seneszierer früher und die Lebensdauer der ganzen Pflanze ist dadurch verkürzt. Die Anzahl der Blätter ist im Vergleich zu WT reduziert (Abbildung 8A,B; Abbildung 35). Die Mutante *tup1* zeigte vereinzelt noch eine weitere Besonderheit. *In vitro*

entwickelte sich bei 4 von 62 homozygoten *tup1* Pflanzen am Hypokotyl des Sprosses auf hormonfreiem Medium spontan ein Kallus. Am Spross entstanden dann nur noch verkümmerte Blätter oder kleine weiße und grüne Kalli (Abbildung 8F,G). Zudem kam es zu vermehrter Adventivwurzelbildung. Die *tup1* Linien sind bisher nur einmal rückgekreuzt worden. Somit kann nicht unterschieden werden, ob es sich hierbei um eine weitere unabhängige Mutation handelt oder einen mit niedriger Penetranz auftretenden Phänotyp.

3.4.1.3 Wurzelentwicklung von *tup1*

Die Primärwurzeln von *tup1* sind nach 10 Tagen ungefähr viermal kürzer als bei Wildtyppflanzen (Abbildung 9A, Abbildung 30). Die Wurzeln wachsen positiv geotrop. Die Wurzelhaare sind wesentlich kürzer und zum Teil gekrümmt. Das Wurzelwachstum der Primärwurzel ist zeitlich begrenzt, die Wurzel hört nach ca. 2 Wochen auf zu wachsen. Stattdessen bilden sich Adventivwurzeln ca. 4 Tage früher als bei WT Pflanzen (Abbildung 34). Auch diese Wurzeln weisen das gekrümmte Wachstum und die veränderten Wurzelhaare auf (Abbildung 9E). Jedoch scheint das Wurzelmeristem nicht in dem Maße beeinträchtigt zu sein, denn die Wurzeln werden wesentlich länger als die Primärwurzel und stellen ihr Wachstum auch nicht nach wenigen Tagen ein. Zudem erscheint auch das Wurzelmeristem dieser Lateral/Adventivwurzeln im Vergleich zum Meristem der Primärwurzel bei oberflächlicher Betrachtung unter dem Mikroskop intakt (Abbildung 9E). Die Wurzelspitze ist jedoch im Vergleich zu WT schmaler und langgestreckter.

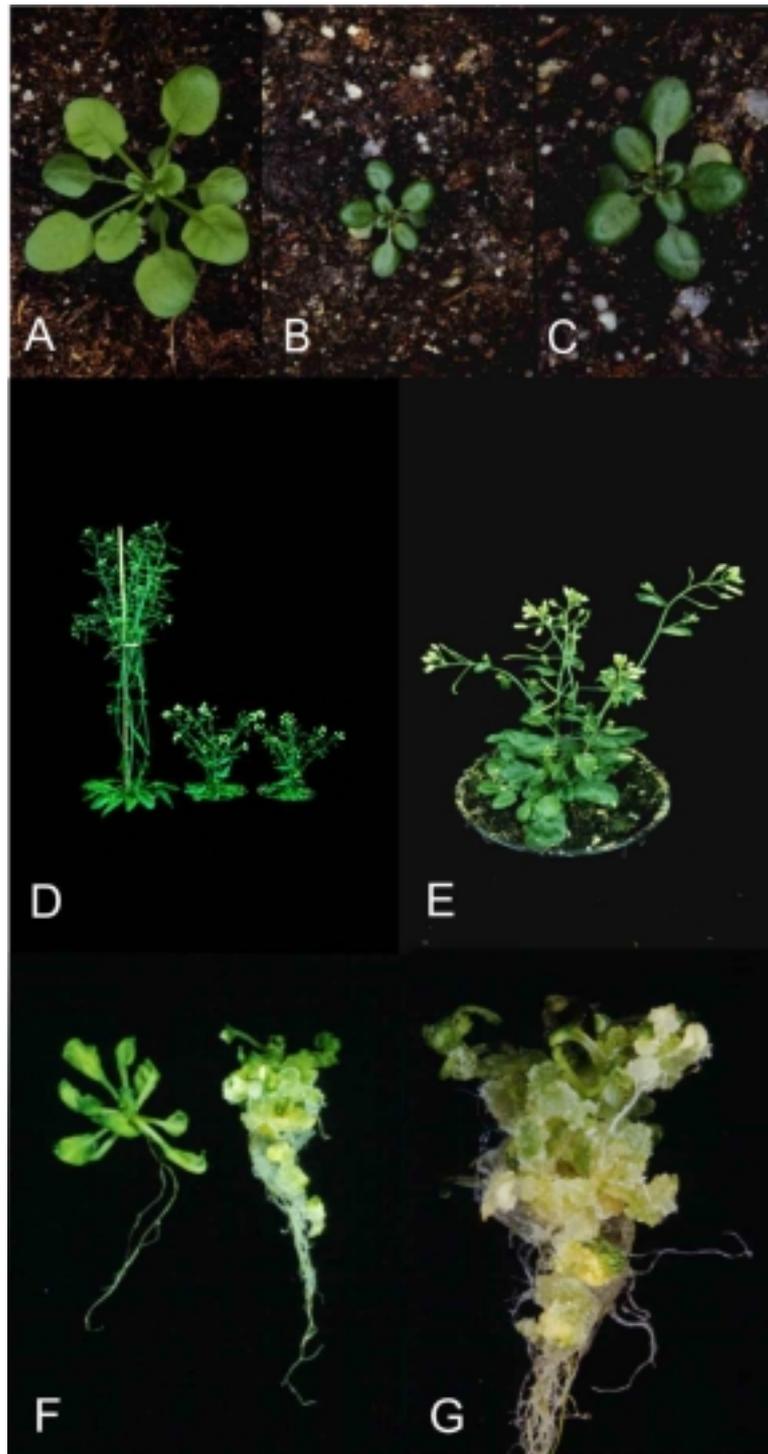


Abbildung 8: Phänotyp von *tup1* Pflanzen. **A:** WT Pflanze 4 wag, **B:** *tup1* Pflanze 4 wag, **C:** *tup1* Pflanze 4 wag, 2x **D:** Links WT Pflanze, daneben 2 *tup1* Pflanzen, 8 wag. **E:** *tup1* Pflanze 8 wag. **F:** Wildtyp und *tup1* Pflanze mit spontaner Kallusbildung im Vergleich, 3 wag, **G:** *tup1*-Pflanze, (Abb. 8F zweifach vergrößert).

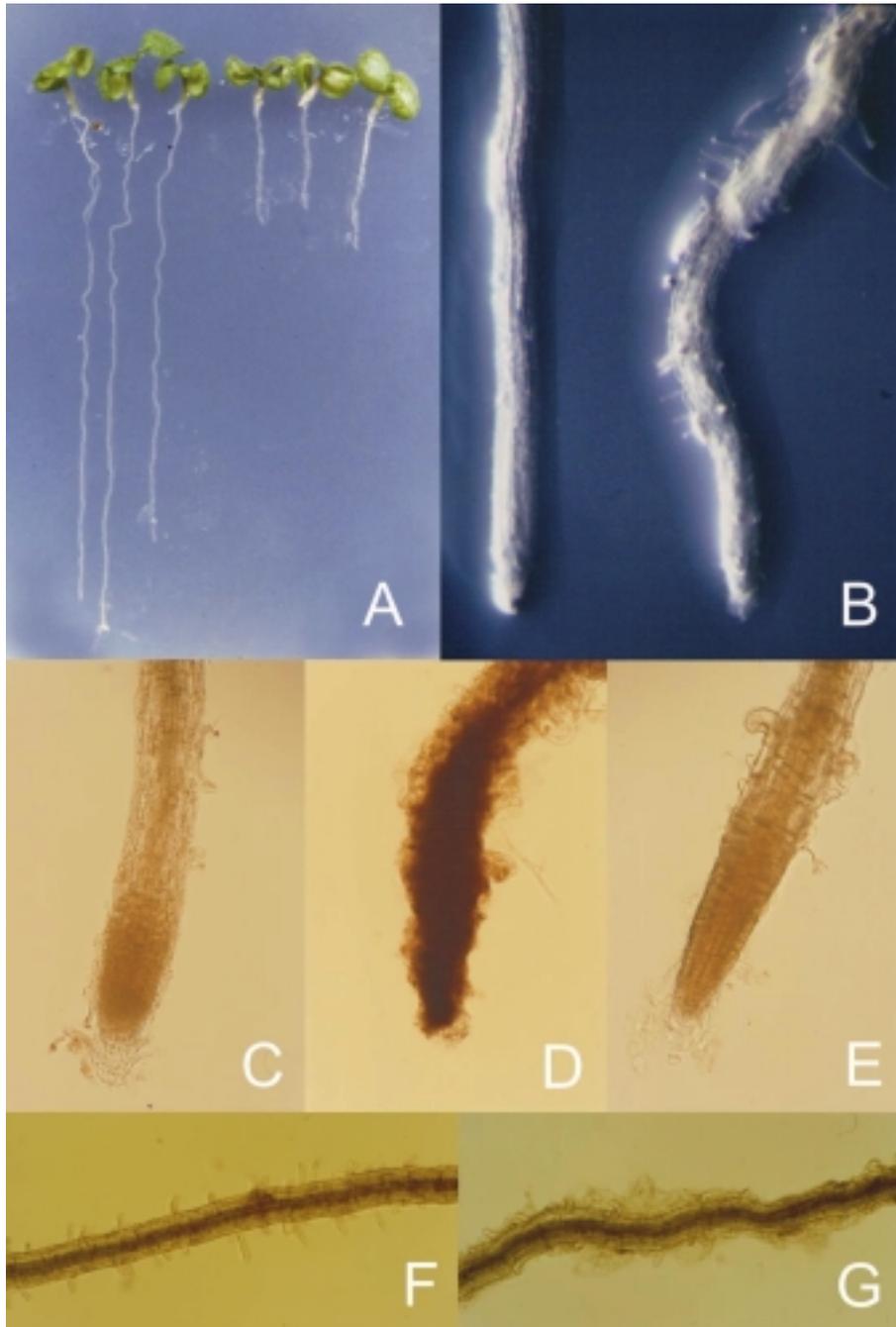


Abbildung 9: **A:** *Arabidopsis*-Pflanzen *in vitro* 10 Tage nach Keimung. Die Kulturschalen standen senkrecht. Von links: 3 WT Pflanzen sowie drei *tup1* Pflanzen. **B:** Primärwurzel von WT (links) und *tup1* im Vergleich (10 dag); Vergrößerung 60x. **C:** Wurzelspitze der Primärwurzel (10 dag) von WT; Vergrößerung 200x. **D:** Wurzelspitze der Primärwurzel (10 dag) von *tup1*; Vergrößerung 100x. **E:** Wurzelspitze der Adventivwurzel (10 dag) von WT; Vergrößerung 200x. **F:** Wurzelhaarbereich von WT, Vergrößerung 100x, **G:** Wurzelhaarbereich von *tup1*; Vergrößerung 100x.

3.4.1.4 Blattentwicklung von *tup1*

Die Blattoberfläche von *tup1* ist um den Faktor 2-3 kleiner als bei WT Blättern (Abbildung 10). Sie sind wesentlich dunkler grün und die Blattoberfläche erscheint glänzend. Häufig sind die Blätter an den Blattenden nach unten eingerollt (Abbildung 10B). Bei den Blättern, die an der Sprossachse entstehen, ist das sehr deutlich zu erkennen (Abbildung 10D). Insbesondere fällt auf, dass die Blätter stärker gewellt sind. Die Blattadern liegen adaxial tiefer in der Blattoberfläche, als bei WT Blättern. Dieser Phänotyp ist wahrscheinlich auf ein unterschiedliches Wachstum von Vaskulargewebe und Interkostalregionen zurückzuführen.

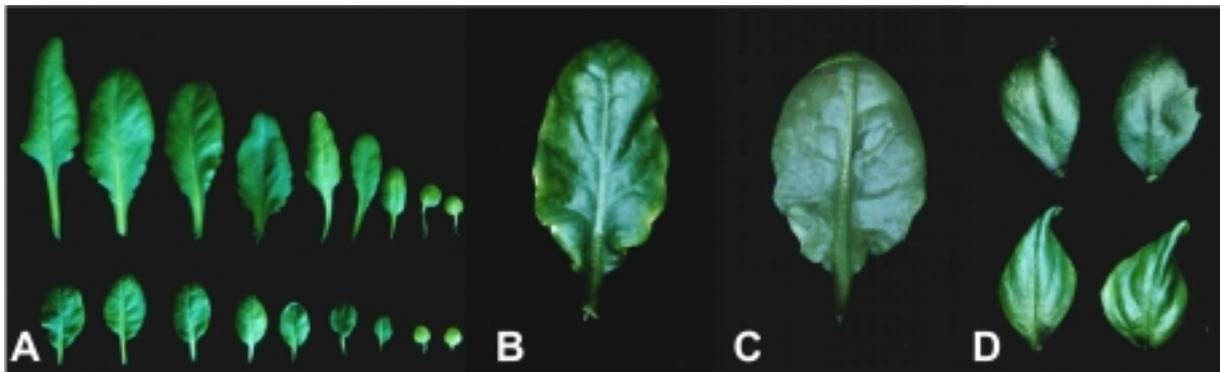


Abbildung 10: A: Blätter von *Arabidopsis*-Pflanzen nach Größe aufgereiht (4 wag). Obere Reihe: WT. Untere Reihe: *tup1*. B: Blatt von *tup1* adaxial und C: abaxial (4 wag); Abb. 10A 3x vergrößert. D: Blätter an der Sprossachse. Je zwei Blätter von WT (oben) und von *tup1* (unten).

3.4.1.5 Blüte und Schotenentwicklung von *tup1*

Die Blüte von *tup1* Mutanten weist makroskopisch keine Auffälligkeiten auf. Die Schoten sind jedoch in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Sie sind wesentlich kürzer, gekrümmt und die Anzahl Samen pro Schote ist reduziert (Daten nicht gezeigt). Die Keimfähigkeit der Samen ist genauso hoch, wie bei WT Samen (Daten nicht gezeigt).

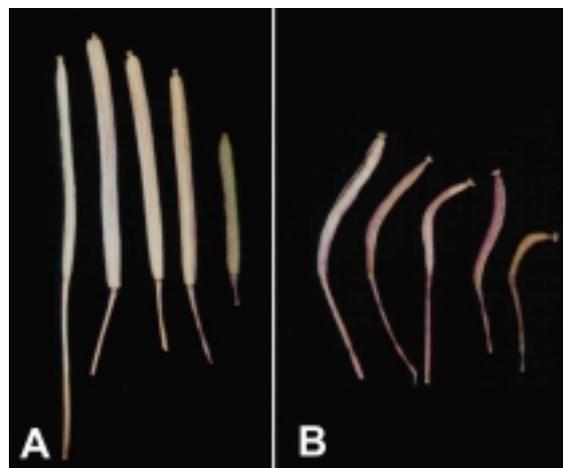


Abbildung 11: Jeweils 5 Schoten von WT (links) und *tup1* (rechts), von verschiedenen Positionen am Blüten spross, nach Größe sortiert.

3.4.2 Phänotypische Beschreibung der *tup2* Mutante

Die *tup2* Mutante lässt sich *in vitro* am besten durch ihre Eigenschaft, Sprosse aus Wurzel- oder Hypokotylgewebe zu bilden, beschreiben. Denn auf Erde zeigt die *tup2* Mutante erst während der Blütenreife gravierende Unterschiede zum WT, da sie nahezu infertil ist. Somit es es zeitaufwändig, die homozygoten *tup2* Mutanten zu identifizieren, da entweder der Blühzeitpunkt abgewartet werden muss, oder Explantate von *tup2* für 3-4 Wochen auf KS-Medium bis zur Sprossbildung kultiviert werden müssen.

3.4.2.1 Kallusbildung *in vitro* von *tup2*

Die Kallusbildung bei *tup2* Wurzel- und Hypokotylexplantaten ist in den ersten 2 Wochen ohne auffällige morphologische Veränderungen. An den Schnittstellen bilden sich nur 1-2mm große Wundkalli aus, die auch bei WT Explantaten vorkommen und die auch in den Vorversuchen auf KS-Medium beobachtet wurden (Abbildung 13A). Danach bilden sich jedoch vor allem an der apikalen Verwundungsstelle kleine, dunkelgrüne Wülste (Abbildung 13B-D), aus denen sich Sprossmeristeme entwickeln. Wenn sich die Meristeme formiert haben, geht die Sprossentwicklung sehr schnell vonstatten. Nach einer Woche hat sich schon einer oder mehrere funktionsfähige Sprosse mit ca. 2-8 Blättern ausgebildet (Abbildung 13E-H). Die Sprosse bilden die ersten 2-5 Tage keine Wurzeln aus. Erst wenn sich am Spross mehrere Blätter entwickelt haben, wachsen Wurzeln aus dem basalen Bereich des Sprosses. Der Spross kann sich zu einer vollständigen Pflanze entwickeln, die auch in der Lage ist, Blütensprosse auszubilden. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, von diesen *in vitro* gezogenen Pflanzen Samen zu erhalten, da sie meist die Umsetzung auf Erde schlecht überleben und wenn, dann schwachwüchsig sind. Zudem waren nur bei 2 von 10 *tup2* Pflanzen einzelne Blüten fertil. Man kann bei *tup2* eigentlich nicht von einem Kallus reden, denn eine Ausbildung von undifferenziertem Kallusgewebe findet nur in sehr geringem Maße statt. Vielmehr entwickelt sich aus Wurzel oder Hypokotylexplantaten ein Sprossmeristem, das zur Blatt- und Wurzelbildung fähig ist.

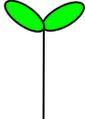
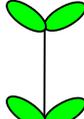
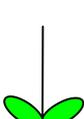
Ort der Kallusbildung					
Anzahl an Wurzel	23	5	0	0	0
Anzahl an Hypokotyl	7	0	2	1	2

Abbildung 12: Statistik über Häufigkeit des Entstehungsortes der Kalli an Wurzel- und Hypokotylexplantaten von *tup2* Mutanten. Die Explantate auf der Abbildung sind so ausgerichtet, dass sie der Orientierung in der Pflanze entsprechen. Insgesamt wurden 36 homozygote *tup2* Pflanzen untersucht.

Auf hormonfreiem Medium unterbleibt diese spontane Sprossbildung sowohl bei WT, als auch bei *tup2* Explantaten ganz. Auch auf KS-Medium sind WT Wurzel- oder Hypokotylexplantate nicht zur Sprossbildung fähig (siehe Abschnitt: Vorversuche). Haben sich die Sprosse an *tup2* Explantaten erst einmal gebildet, können sie auf hormonfreiem Medium weiterwachsen. Die Sprosse an Wurzel- und Hypokotylexplantaten werden vornehmlich auf der basalen, bzw. apikalen Seite gebildet (Abbildung 12). Nur 22 % der beobachteten Sprossbildungen entstanden nicht an der dem apikalen Sprossmeristem der Pflanze zugewandten Seite, sondern entweder in der Mitte des Explantats oder an dessen basaler Verwundungsstelle.

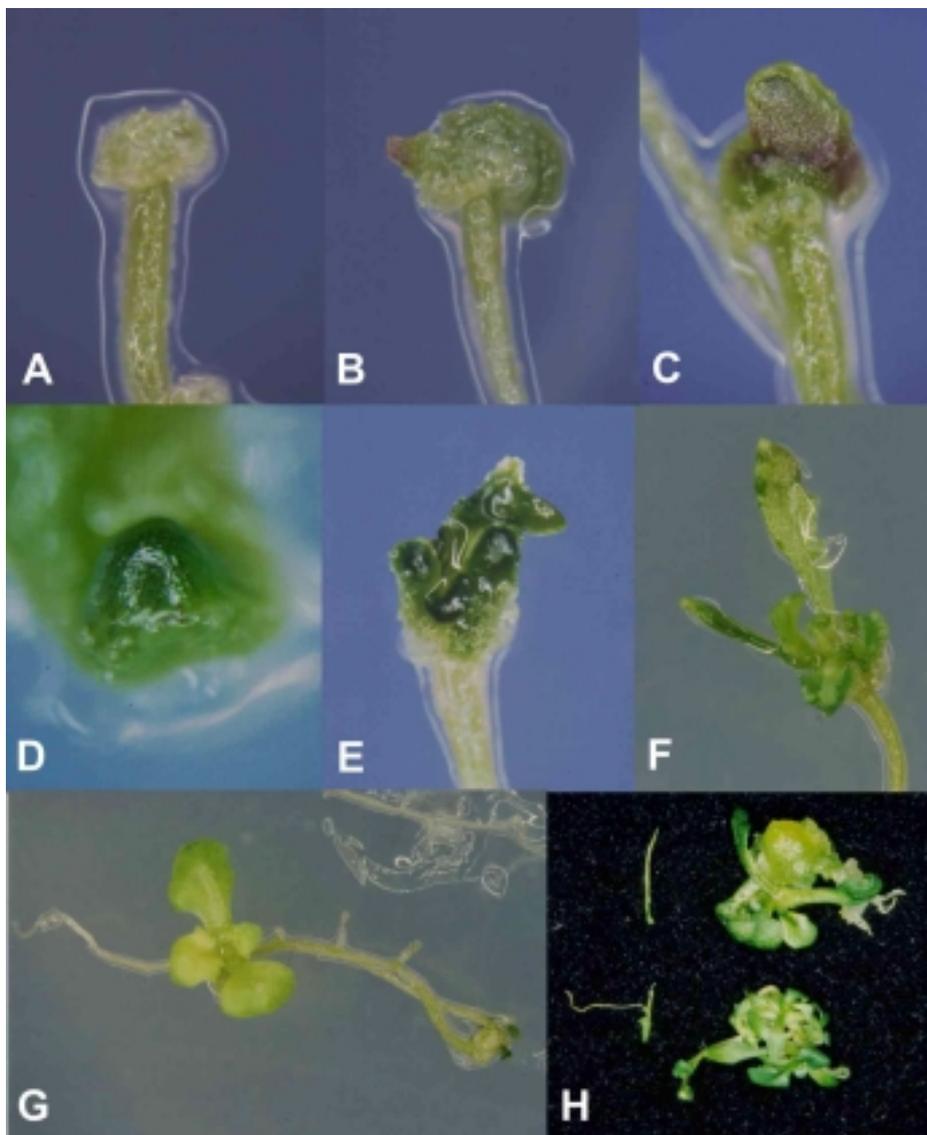


Abbildung 13: Wurzelexplantate von WT und *tup2* auf KS-Medium. **A:** Normale Kallusbildung bei Wurzelgewebe von WT, 16 dac, **B:** Wundkallusbildung mit nachfolgender Ausbildung eines Sprossmeristems, 16 dac. **C-D:** Detailaufnahmen früher Stadien der Sprossmeristembildung. **E-G:** Verschiedene Stadien der fortschreitenden Sprossentwicklung, 26 dac. **H:** Wurzelexplantate von WT (links) und *tup2* (rechts), 35 dac. dac = Tage nach Kultivierung auf KS-Medium.

3.4.2.2 Pflanzenphänotyp von *tup2* auf Erde

Die Blütensprosse von *tup2* Pflanzen erreichen nur etwa die halbe Höhe von WT Sprossen (Abb. 14). Durch die kurzen, samenlosen Schoten wirken die *tup2* Pflanzen sparrig. Aber außer diesem Merkmal und einer kleineren Blattrosette zeigen sich keine großen Unterschiede zum Wildtyp.

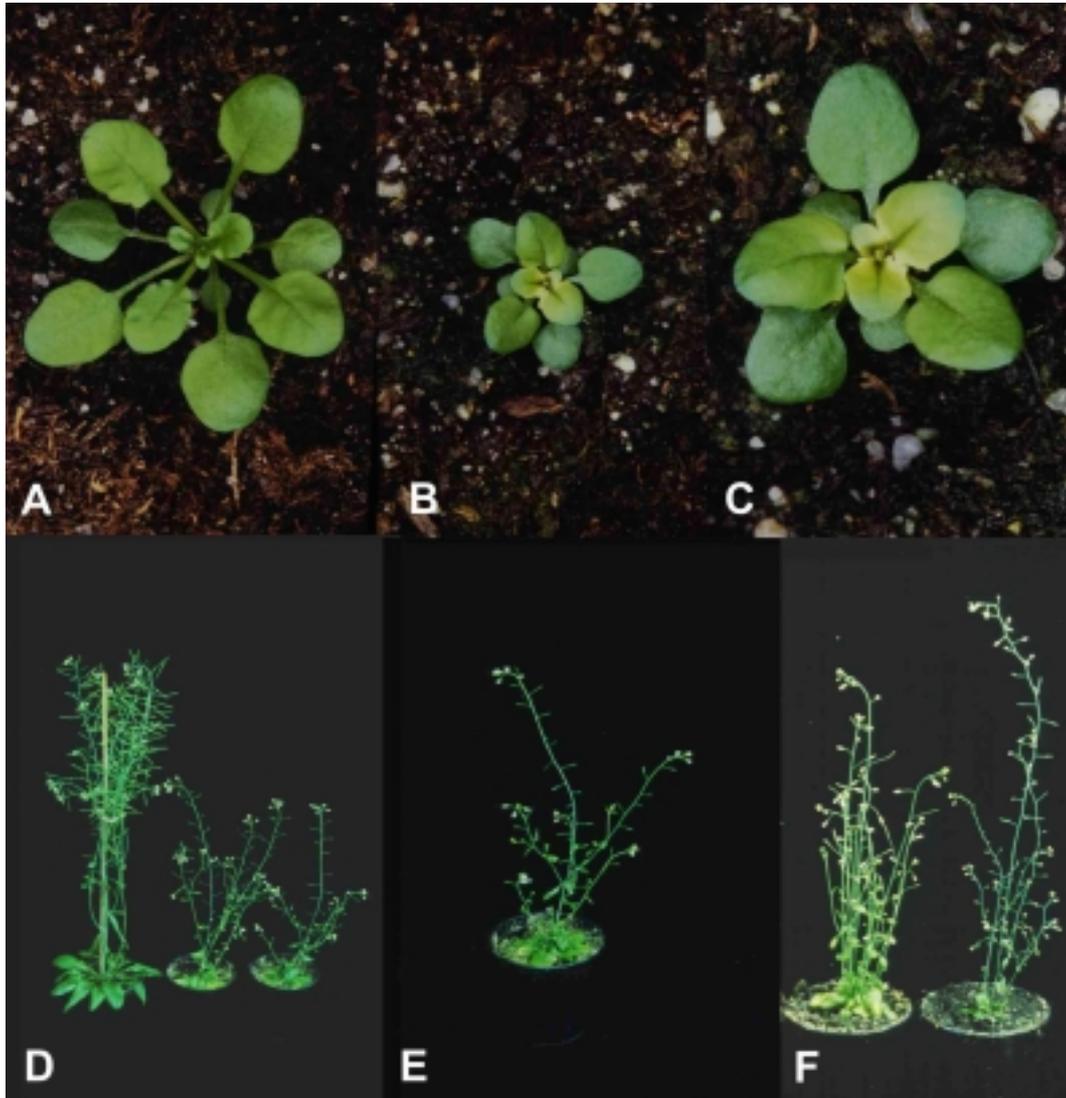


Abbildung 14: *Arabidopsis* Pflanzen auf Erde **A:** WT Pflanze 4 wag, **B:** *tup2* Pflanze 4 wag, **C:** *tup2* Pflanze 4 wag, Vergrößerung 6x, **D:** Links WT Pflanze, daneben zwei *tup2* Pflanzen, 8 wag. **E:** *tup2* Pflanze 8 wag. **F:** *amp1* und *tup2* Mutante 8 wag.

3.4.2.3 Wurzelentwicklung von *tup2*

Die Wurzelentwicklung von *tup*

2 unterschied sich weder hinsichtlich morphologischer Merkmale noch hinsichtlich des Wachstums von der Entwicklung bei WT Wurzeln.



Abbildung 15: *Arabidopsis in vitro* 10 Tage nach Keimung. Kulturschalen standen senkrecht. Drei WT Pflanzen (links) und drei *tup2* Pflanzen (rechts).

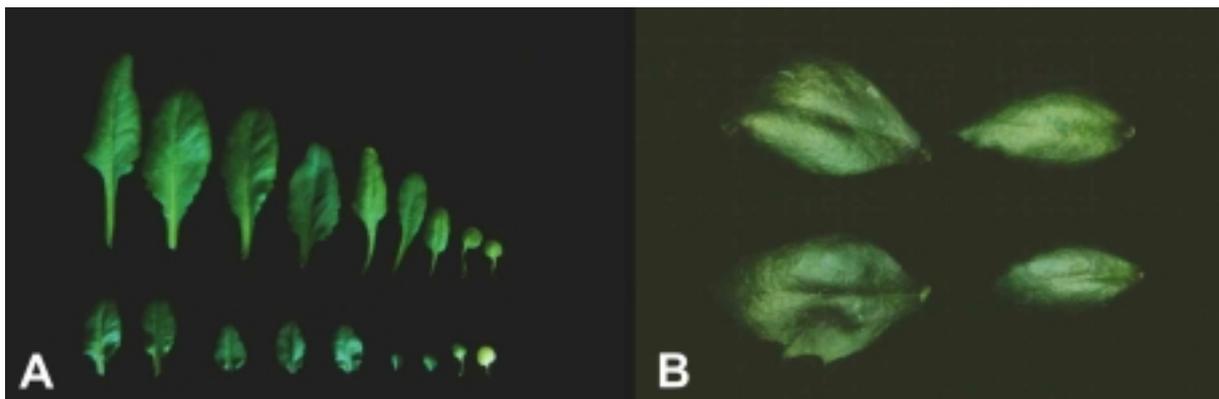


Abbildung 16: **A:** Blätter von *Arabidopsis*-Pflanzen der Größe nach aufgereiht (4 wag). Obere Reihe: WT, Untere Reihe: *tup2*. **B:** Blätter an der Sprossachse. Je zwei Blätter von WT (links) und von *tup2* (rechts).

3.4.2.4 Blattentwicklung von *tup2*

Vier Wochen nach Keimung waren die Blätter von *tup2* im Vergleich zu WT wesentlich kleiner. Zum Teil waren sie von hellerem Grün. Dies konnte jedoch nicht in jedem Falle beobachtet werden. Die veränderte Farbe deutet unter Umständen auf eine gewisse Anfälligkeit gegenüber Stressfaktoren hin. 8 Wochen nach Keimung konnten keine Unterschiede in der Helligkeit der Blätter von WT und *tup2* ausgemacht werden. Die Entwicklung der Blattform vom ganzrandigen jungen Blatt hin zum leicht gesägten älteren Blatt vollzieht sich auch bei *tup2*. Die Blätter von *tup2* Mutanten haben jedoch kürzere Petiolen. Außerdem sind die Blätter an der Sprossachse von *tup2* im Vergleich zu WT Blättern schmaler und kleiner (Abbildung 16B).

3.4.2.5 Blüte und Schotenentwicklung von *tup2*

Die meisten *tup2* Pflanzen sind infertil. Es gab nur vereinzelt Pflanzen bei denen ein paar Blüten fertil waren und keimungsfähige Samen lieferten. Der Stempel von *tup2* zeigt keine makroskopisch erkennbaren Anomalien (Abbildung 17A,B). Die Staubblätter sind jedoch in zweifacher Hinsicht verändert. Zum einen wachsen die Staubblätter nicht so lang aus, dass sie den Stempel erreichen (Abbildung 17A,B). Zum anderen ist die Pollenproduktion stark reduziert. So zeigten sich an den Pollensäcken nur vereinzelt Pollen (Abbildung 17A,B und 17C,D). Der WT Pollen hat zum Zeitpunkt der Reife des Stempels eine hellgelbe Farbe. Die *tup2* Pollen waren zu diesem Zeitpunkt schon dunkelgelb. Es wurde versucht, an 10 Pflanzen eine künstliche Bestäubung durchzuführen, was jedoch in keinem der Fälle zu einer Befruchtung führte. Wenn eine *tup2* Pflanze fertil ist, dann sind das nur einzelne Blüten an einem bestimmten Spross. In Abbildung 17E werden neben zwei WT Schoten, eine *tup2* Schote mit Samen und vier *tup2* Schoten ohne Samen gezeigt. Die fertile *tup2* Schote ist verkürzt, sonst aber genauso geformt wie WT Schoten. Es wurden reziproke Rückkreuzungen mit Col-1WT durchgeführt. Es gelang homozygote *tup2* Blüten mit WT Pollen zu befruchten und keimungsfähige Samen zu erhalten. Die reziproke Kreuzung mit *tup2* Pollen war nicht erfolgreich. Für die reziproken Kreuzungen mit WT wurden jeweils 5 Blüten von WT, bzw. *tup2* eingesetzt.

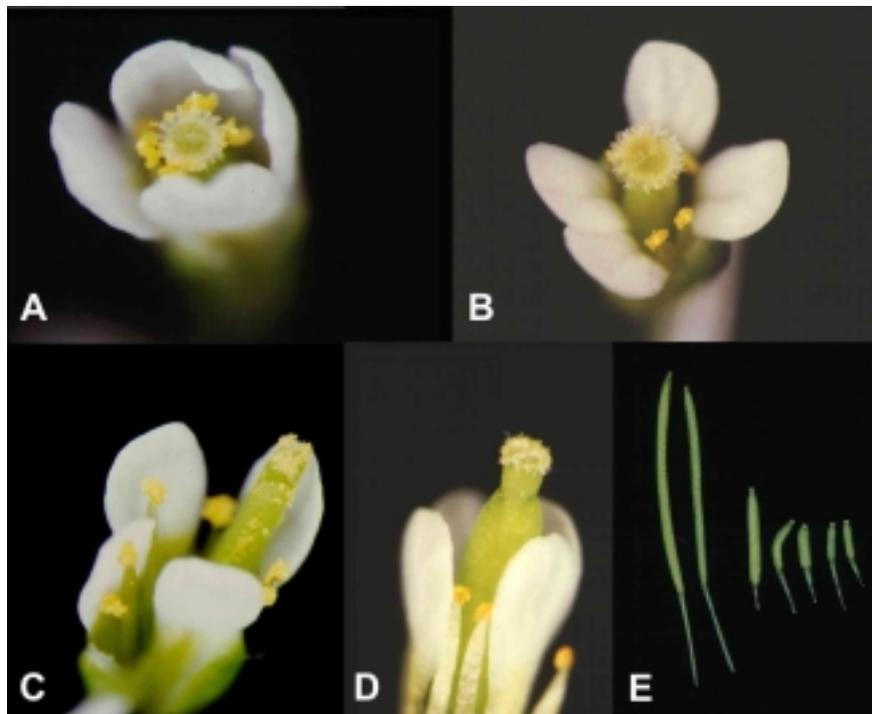


Abbildung 17: **A:** Blüte von *Arabidopsis* WT während der Selbstbestäubung, **B:** Blüte von *tup2* während der Bestäubung, **C:** Blüte von *Arabidopsis* WT nach der Bestäubung, **D:** Blüte von *tup2* nach Verblühen von Staubblatt und Stempel. **E:** Ausgewachsene Schoten von WT (zwei) und *tup2* (fünf).

3.4.2.6 Vergleich mit der Cytokinin überproduzierenden Mutante *amp1*

Die Sprosskallusbildung an Wurzel- und Hypokotylexplantaten könnte mit einer erhöhten endogenen Cytokininkonzentration oder Cytokininhypersensitivität zusammenhängen. So konnte in den Hormonmatrixversuchen von NAA und 2iP (siehe Vorversuche, Abbildung 1) gezeigt werden, dass ein hohes Cytokinin/Auxinverhältnis zur Ausbildung von Sprossen an Explantaten führt. *amp1* Wurzelexplantate bildeten *in vitro* auf Sprossinduktionsmedium mit zehnfach höherer Frequenz Sprosse aus als Explantate von WT (Chaudhury und Signer, 1989; Chaudhury et al. 1993). Auf KS-Medium bildeten *amp1* Explantate schon nach 5 Tagen Sprosse aus (Tabelle 4). Deshalb wurde der Pflanzenphänotyp von *amp1* und *tup2* verglichen. Unterschiede zeigten sich schon bei der Keimlingsentwicklung, *amp1* Keimlinge bilden zum Teil drei Kotyledonen aus, was bei *tup2* nicht beobachtet werden konnte. Die Anzahl der Blütenprosse bei *amp1* ist im Vergleich zu WT und *tup2* Pflanzen deutlich erhöht (Abbildung 14F). Des Weiteren bilden *amp1* Mutanten mehr Samen als *tup2* Mutanten (Daten nicht gezeigt). Beiden Mutanten ist zu eigen, dass sie kleinwüchsiger sind und die Schoten stark verkürzt sind.

3.4.3 Phänotypische Beschreibung der *tup3* Mutante

3.4.3.1 Kallusbildung *in vitro* von *tup3*

Sieben Tage nach Auslegen der Wurzel- und Hypokotylexplantate von *tup3* Mutanten auf KS-Medium sind Kalli sichtbar. Meist beginnt die Kallusbildung an den Schnittstellen. Mit der Kallusbildung einher geht eine Verdickung der Wurzeln und des Hypokotyls. Nach weiteren 10 Tagen bilden sich am ganzen Gewebestück gelbliche oder weißliche Kalli, die undifferenziert weiter wachsen (Abbildung 18). Gleichzeitig wachsen am Explantat einzelne Wurzeln aus, die stetig weiter wachsen (auch noch nach 5 Wochen) und Seitenwurzeln ausbilden. An den neu gebildeten Wurzeln entstehen ebenfalls nach 1-2 Wochen Kalli. Setzt man den Kallus alle 4 Wochen auf neues KS-Medium um, kann man ihn immer weiter propagieren. Auf der Oberfläche bilden sich kleine durchsichtige, weiße Bläschen, die z.T. sehr kurzen Wurzelhärchen ähneln. Das wuchernde Gewebe ist hart und lässt sich mit einem Skalpell nur unter starkem Druck schneiden. Der Kallus wächst auch auf hormonfreiem Medium weiter, dort aber langsamer. Das Kallusgewebe ist weder auf hormonfreiem Medium, noch auf Medien mit verschiedenen Cytokinin- und Auxinkonzentrationen in der Lage, Chlorophyll oder Sprosse auszubilden. Es entsteht nur Kallusgewebe und Wurzeln. Auch bei exogener Applikation von Cytokinin kommt es nicht zur Ausbildung von Sprossen oder zum Ergrünen der Kalli (Tabelle 7).

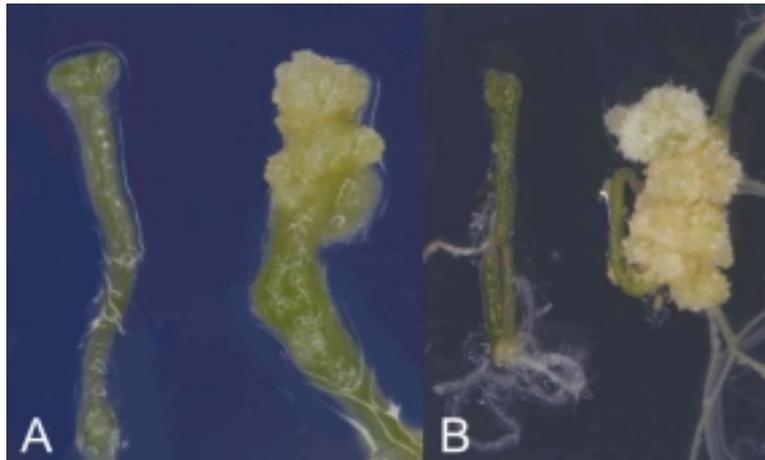


Abbildung 18: Wurzelexplantate von WT (links) und *tup3* (rechts). **A:** 16 Tage bzw. **B:** 28 Tage nach Auslegen auf KS-Medium.

3.4.3.2 Kallusbildung an *tup3* Mutanten *in vitro*

tup3 Pflanzen bilden bei Wachstum *in vitro* auf hormonfreiem Medium spontan Kalli aus. Die Kallusbildung wird 4-5 Wochen nach Keimung der *tup3* Mutanten deutlich sichtbar. Bei *tup3* Pflanzen, die auf Erde wachsen, ist diese Kallusbildung bisher noch nicht beobachtet worden. Der Kallus beginnt im Übergangsbereich zwischen Wurzel und Hypokotyl (= W/H) zu wachsen. In diesem Bereich kommt es erst zu Verdickungen des Hypokotyls und der Wurzel (Abbildung 19). Dann wachsen an mehreren Stellen von Wurzel und Hypokotyl weiße Kalli mit durchsichtigen Zellen an der Oberfläche aus. Diese Kallusbildung tritt 1-2 Wochen nach dem ersten Erscheinen auch an den älteren Teilen der Wurzel auf. Nach 8 Wochen hat sich der W/H durch das stete Kalluswachstum um den Faktor 3-4 verdickt. Der apikale Bereich des Hypokotyls und das Sprossmeristem sind nicht davon betroffen. Bei Dunkelkeimung der *tup3* Pflanzen kommt es ebenfalls nach 3 Wochen zu einer Kallusbildung am W/H (Abbildung 19E). Dieser Kallus ist beschränkt auf den W/H. Im Gegensatz zu WT Wurzeln wachsen die Wurzeln von *tup3* auch im Dunkeln weiter (Abbildung 29).

3.4.3.3 Pflanzenphänotyp von *tup3* auf Erde

Der Pflanzenphänotyp von *tup3* zeigt sich schon zwei Wochen nach Keimung. Die Blätter sind schmaler und kürzer (jeweils um den Faktor 2-3) und haben eine lanzettliche Form. Vier Wochen nach Keimung haben die *tup3* Pflänzchen nur 50% des Blattrosettendurchmessers von WT Pflanzen (Abbildung 20B). Der Blühzeitpunkt der *tup3* Pflanzen ist verzögert. Nach 8 Wochen haben erst ca. 30 % der *tup3* Pflanzen einen Blüten spross ausgebildet, hingegen 100% der WT Pflanzen (Abbildung 36). Statt eines Blüten sprosses wachsen weitere Blätter am vegetativen Sprossmeristem. Nachdem die Blüten sprossbildung eingesetzt hat,

entstehen zum Teil über 15 zusätzliche Blütenprosse (Abbildung 20C,F). WT Pflanzen bilden im Vergleich dazu meist nur ein bis vier Blütenprosse aus (Daten nicht gezeigt). In den Blattachseln der Blütenprosse zeigen sich statt sekundärer Blütenprosse bei ca. 10% der Pflanzen Blattrosetten (Abbildung 20G).

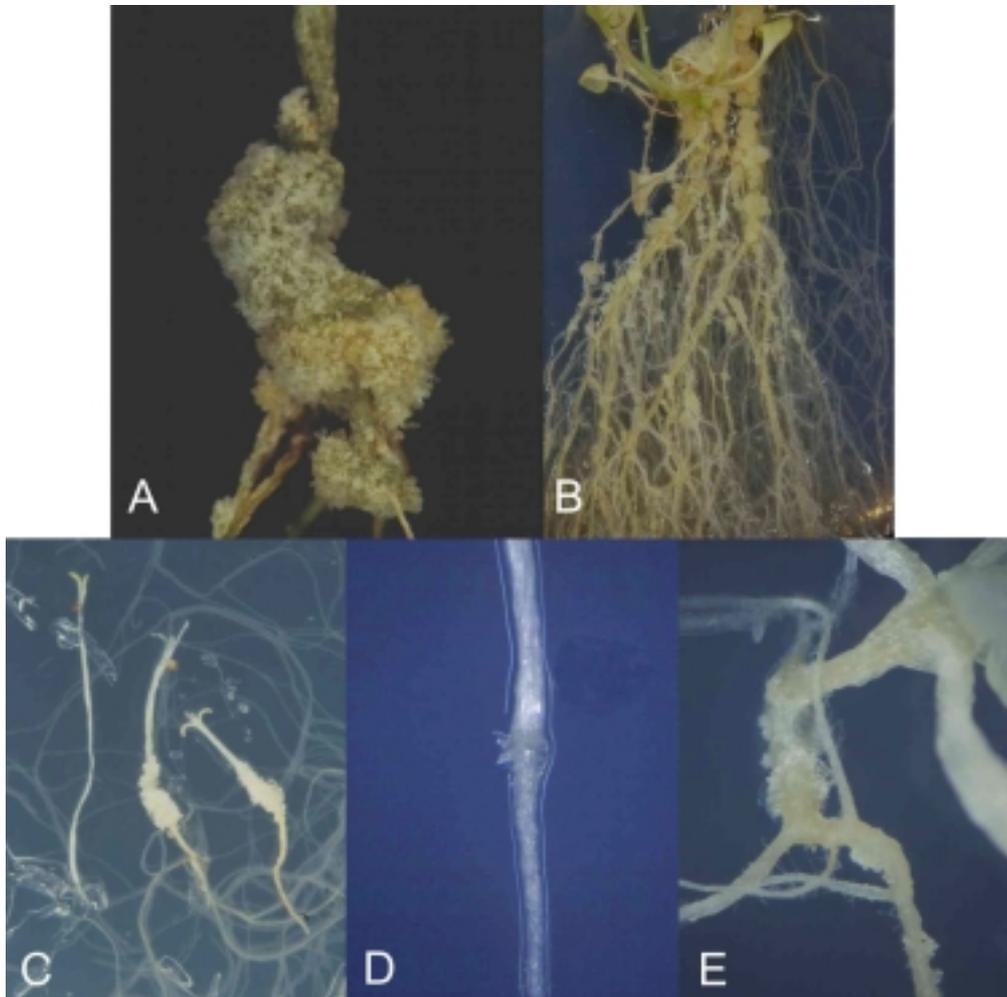


Abbildung 19: Spontane Kallusbildung am Wurzel/Hypokotylbereich von *tup3* auf hormonfreiem Medium *in vitro*. **A:** Kallus an 8 Wochen alter *tup3* Pflanze. **B:** Wurzel- und Kallusbildung an 13 Wochen alter Pflanze. **C:** Eine WT Pflanze (links) und zwei *tup3* Pflanzen (rechts), 6 wag im Dunkeln. **D:** Wurzel/Hypokotylbereich, 4 wag, von WT und **E:** *tup3*.

3.4.3.4 Wurzelentwicklung von *tup3*

Die Primärwurzeln von *tup3* sind im Schnitt 40% kürzer als WT Wurzeln (Abbildung 21A, Abbildung 30). Das Wurzelmeristem von *tup3* weist bei zweihundertfacher Vergrößerung keine auffälligen Unterschiede zu WT Wurzelmeristemen auf (Abbildung 21B,C). Auch die Wurzelhaarentwicklung und die grundlegende Wurzelmorphologie sind zehn Tage nach Keimung nicht sichtbar verändert (Abbildung 21D,E). Erst die Ausbildung von Kallusgewebe verändert die Morphologie der Wurzel. Aufgrund des Kalluswachstums bricht die Epidermis auf und das Wurzelparenchym ist von Kallusgewebe durchdrungen. Bei den *tup3* Mutanten entstehen vermehrt Adventiv- und Lateralwurzeln (Abbildung 34). Nach vier Wochen haben

sich bei *tup3* $13 \pm 3,5$ Adventivwurzeln im Vergleich zu $1,5 \pm 0,5$ Adventivwurzeln bei WT gebildet (Stichprobe je 5 Pflanzen).

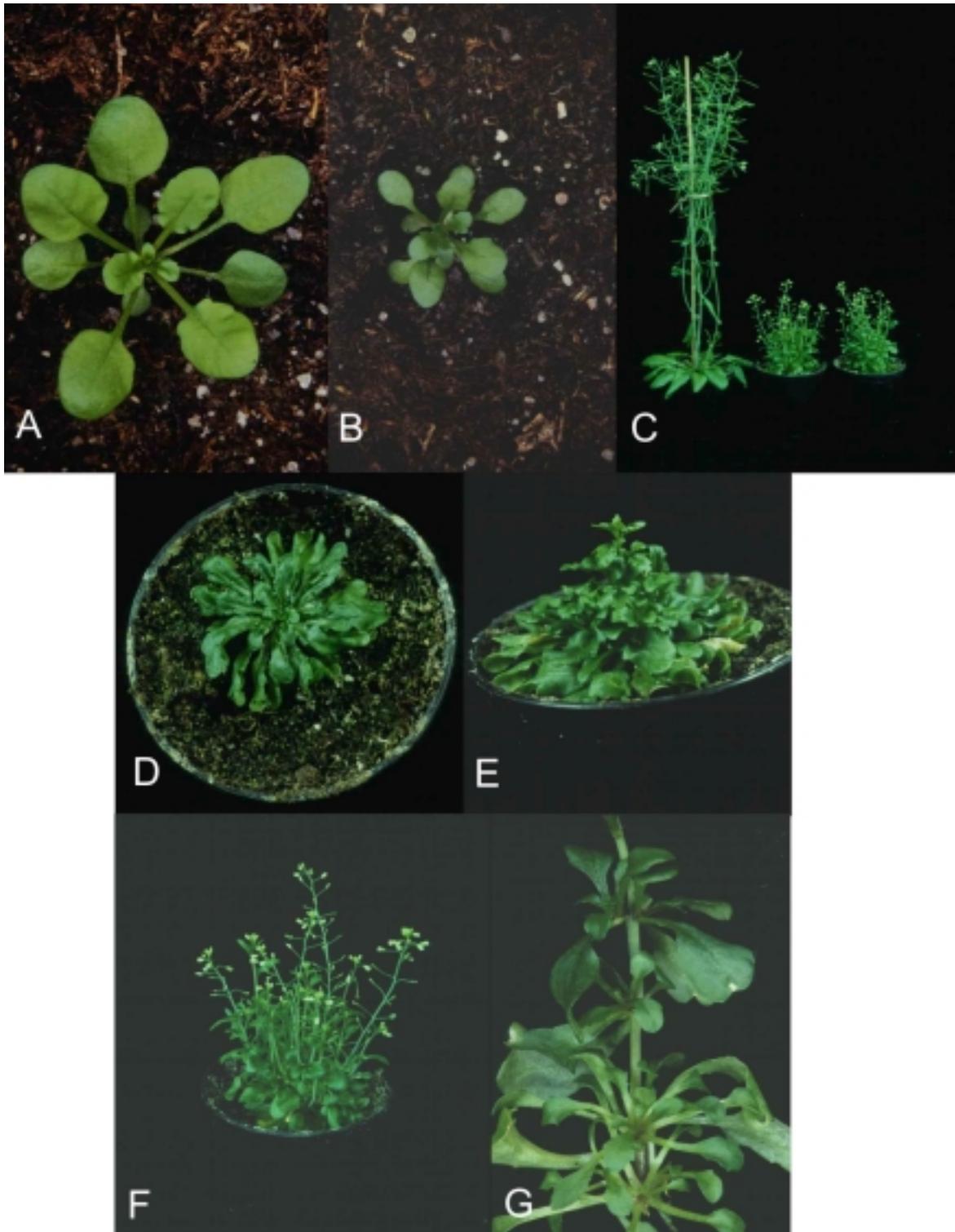


Abbildung 20: Pflanzenphänotyp von *tup3* Mutanten. **A:** WT Pflanze 28 dag, **B:** *tup3* Pflanze 28 dag, **C:** WT Pflanze (links) und zwei *tup3* Pflanzen (rechts), **D:** Blattrosette von *tup3* (von oben), 8 wag, **E:** Entwicklung des Blütensprosses an *tup3* Pflanze, 8 wag, **F:** blühende *tup3* Pflanze, 8 wag, **G:** Rosettenbildung in den Blattachseln am Blütenspross von *tup3*.

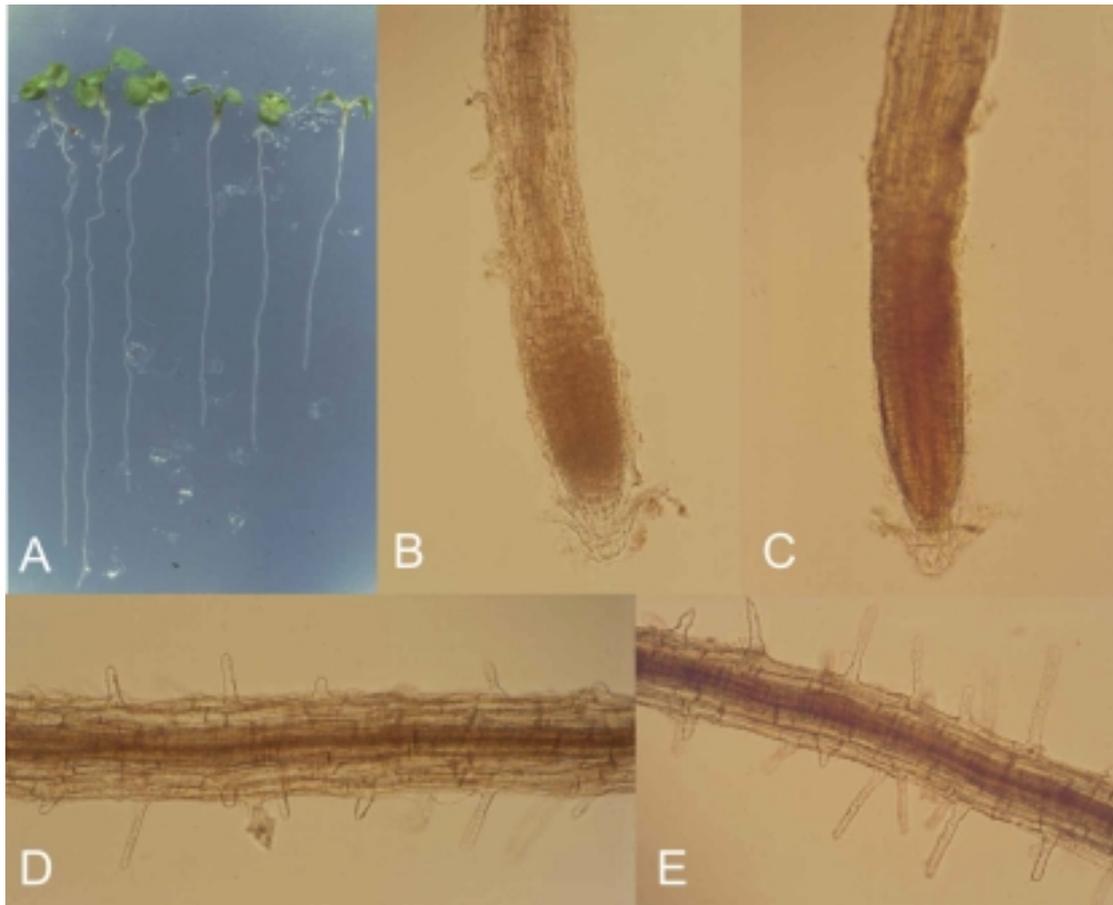


Abbildung 21: Wurzelentwicklung von *tup3* Pflanzen. **A:** *Arabidopsis* Pflanzen *in vitro*, 10 dag. Die Kulturschalen standen senkrecht. Je 3 WT Pflanzen (links) und *tup2* Pflanzen (rechts), **B:** Wurzelspitze der Primärwurzel von WT, 10 dag; Vergrößerung 200x. **C:** Wurzelspitze der Primärwurzel von *tup3*, 10 dag; Vergrößerung 200x. **D:** Wurzelhaarbereich von WT; Vergrößerung 200x. **E:** Wurzelhaarbereich von *tup1*; Vergrößerung 200x.

3.4.3.5 Blattentwicklung von *tup3*

Die Kotyledonen von *tup3* Pflanzen zeigen keine Auffälligkeiten im Vergleich zu WT Pflanzen, aber schon die ersten Folgeblätter von *tup3* sind kleiner und länglicher als Blätter von WT (Abbildung 20A,B). Auch nachfolgende Blätter sind um den Faktor 2-3 schmaler und kürzer (Abbildung 22). Die Blätter am Blütenstross zeigen die gleichen Charakteristika (Abbildung 22C). Die Blätter sind unregelmäßig ausgebuchtet und die Oberfläche ist gewellter als bei WT (Abbildung 20D,E).



Abbildung 22: Vergleich der Blattformen von WT und *tup3* Blättern. **A:** Blätter von *Arabidopsis*-Pflanzen der Größe nach aufgereiht, 4 wag. Obere Reihe: WT. Untere Reihe: *tup3*. **B:** Typisches *tup3* Blatt adaxial. **C:** Blätter die an der Sprossachse wachsen. WT Blätter (obere Reihe), *tup3* Blätter (untere Reihe).

3.4.3.6 Blüten- und Schotenentwicklung von *tup3*

Die *tup3* Pflanzen sind bis auf wenige Ausnahmen infertil. Unter ca. 50 homozygoten Pflanzen gab es nur zwei Pflanzen, die keimfähige Samen produziert haben. Im Normalfall sind in den verkümmerten Schoten der *tup3* Pflanzen keine Samen (Abbildung 23E). Die Narbe weist keine erkennbaren Anomalien auf (Abbildung 23A,B). Die normal langen Staubblätter tragen stark verkümmerte, dunkelgelbe Pollensäcke, die zur Zeit der fruchtbaren Narbe flach und trocken sind (Abbildung 23B). An den Pollensäcken sind nur zum Teil einzelne Pollen zu sehen (Abbildung 23C,D). Es wurden reziproke Bestäubungsversuche mit jeweils zehn WT und *tup3* Blüten vorgenommen. Keine der Bestäubungen war erfolgreich.



Abbildung 23: Blüten- und Schotenentwicklung von *tup3*. **A:** Blüte von *Arabidopsis* WT Pflanze während der Selbstbestäubung. **B:** Blüte von *tup3* Pflanze während der Bestäubung. **C:** Blüte von *Arabidopsis* WT Pflanze nach der Bestäubung. **D:** Blüte von *tup3* nach Verblühen von Staubblatt und Stempel. **E:** Ausgewachsene Schoten, je zwei WT (links) und *tup3* (rechts) Schoten.

3.4.4 Phänotypische Beschreibung der *tup4* Mutante

tup4 Wurzelexplantate bilden auf KS-Medium gelbliches Kallusgewebe aus. Die *tup4* Pflanzen zeigen einen kleineren Wuchs als WT Pflanzen und einen um ca. drei bis vier Wochen verzögerten Blühzeitpunkt.

Der Phänotyp der *tup4* Mutanten wird weniger detailliert besprochen, da aus Zeitgründen der Schwerpunkt der phänotypischen Analysen auf die anderen vier *tup* Mutanten gelegt wurde.

3.4.4.1 Kallusbildung von *tup4* *in vitro*

Die *tup4* Wurzel- und Hypokotylexplantate bilden ca. 14 Tage nach Auslegen auf KS-Medium gelbliche Kalli an den Verwundungsflächen aus (Abbildung 24). Diese Kalli sind sehr weich und zerfallen, wenn sie mit der Pinzette angehoben werden. Sie haben eine gallertartige und transparente Struktur. Während sich an den Hypokotylexplantaten weder Wurzeln noch Sprosse ausbilden, können an Wurzelexplantaten vereinzelt Wurzeln auswachsen. Die Kallusbildung beginnt an den Verwundungsflächen, aber nach 4 Wochen wächst der Kallus auf dem gesamten Explantat (Abbildung 24D).

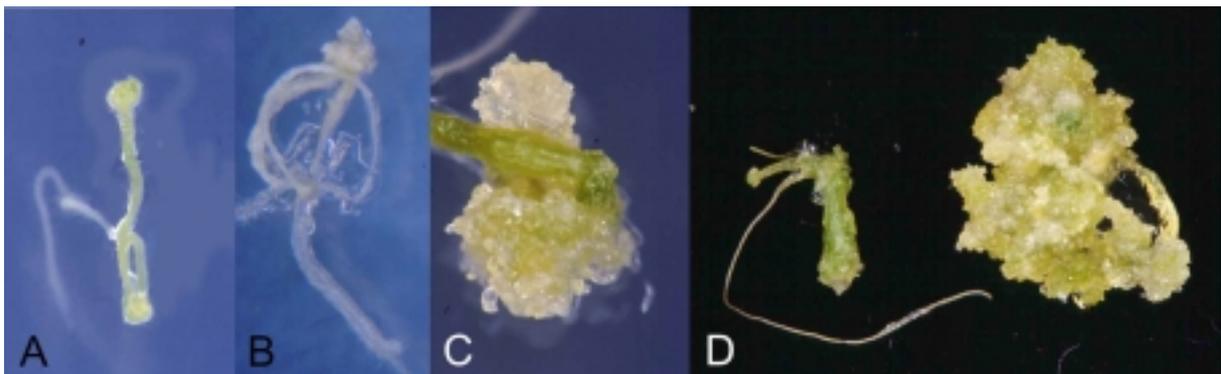


Abbildung 24: Entwicklung von Kallus aus *tup4* Explantaten auf KS-Medium. **A:** Frühe Kallusbildung an Verwundungsfläche von *tup4* Wurzelexplantat, 14 Tage nach Auslegen, Vergrößerung 48x. **B:** Hypokotylexplantat von WT Pflanze (links) und *tup4* Pflanze (rechts) 28 Tagen nach Auslegen auf KS-Medium.

3.4.4.2 Phänotyp von *tup4* Pflanzen

Die *tup4* Pflanzen sind kleinwüchsig, sie werden nicht größer als 10 cm. Die Blattrosette besteht aus sehr gleichförmigen, ganzrandigen Blättern (Abbildung 25B). Die Blätter sind von hellerem Grün als WT Blätter und um den Faktor 3-4 kleiner. Die *tup4* Pflanzen haben einen verzögerten Blühzeitpunkt. Acht Wochen nach Keimung hat sich ein Blütenspross von 1-2 cm Länge ausgebildet (Abbildung 25B). WT Pflanzen haben im Vergleich dazu voll ausgebildete Blütensprosse von ca. 30 cm Höhe. Die sekundären Blütensprosse, die aus den Blattachsen wachsen, zweigen vom einzigen Hauptblütenspross im Winkel von ca. 45°

schräg nach oben ab (Abbildung 25C). Im Gegensatz dazu wachsen die sekundären Blütenstängel von WT Pflanzen sehr steil nach oben (Winkel von 10-20°).

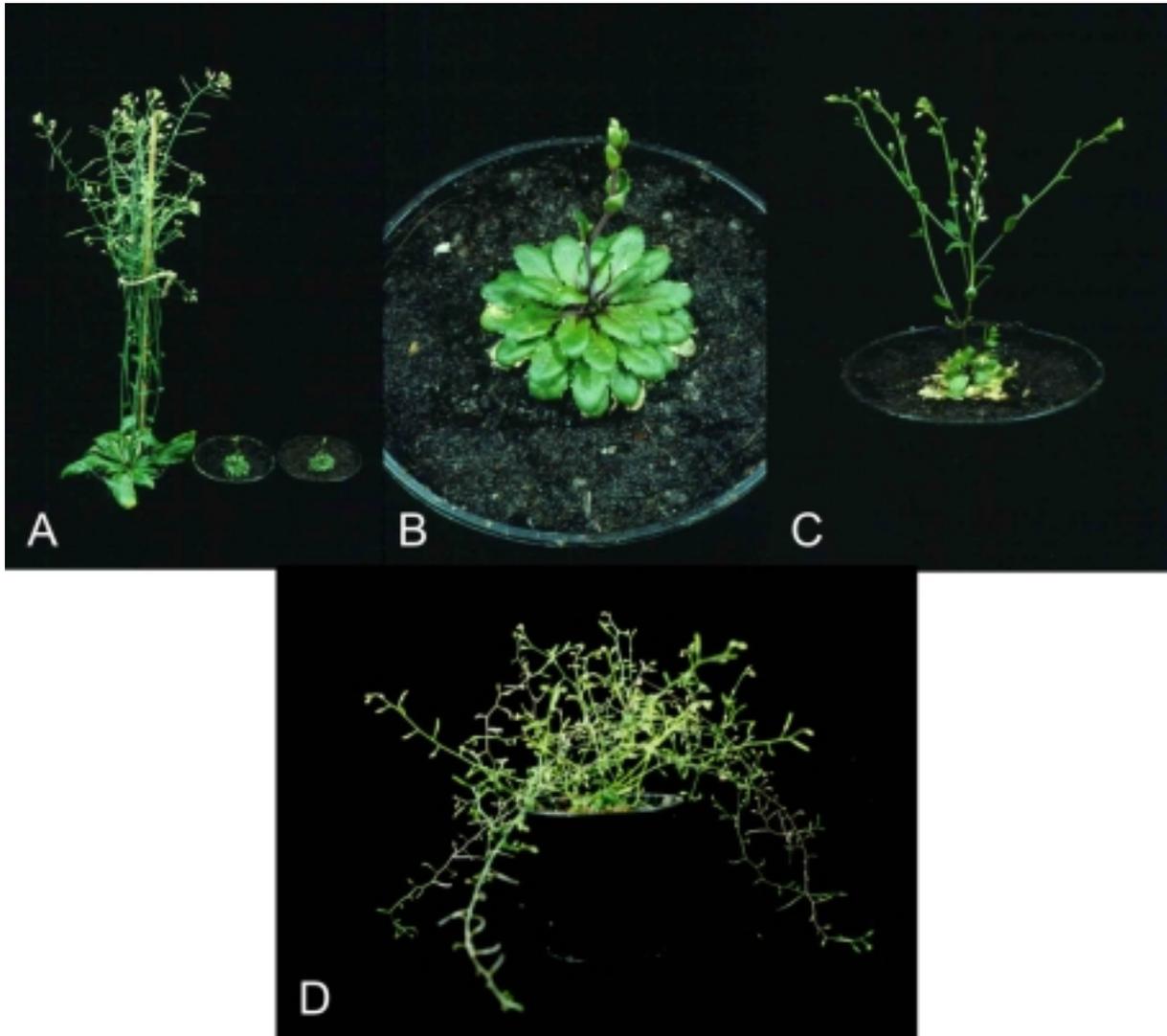


Abbildung 25: Phänotyp von *tup4* Pflanzen **A:** WT Pflanze (links) und zwei *tup4* Pflanzen (rechts) 8 wag. **B:** *tup4* Pflanze 8 wag. **C:** *tup4* Pflanze 10 wag. **D:** *tup4* Pflanze 13 wag.

3.4.4.3 Blattentwicklung von *tup4*

Die Blätter von *tup4* sind alle, im Vergleich zu den heteromorphen WT Blättern, sehr gleichförmig ausgebildet. Die Blattrosette wirkt dadurch sehr regelmäßig. Die Blätter sind klein (< 1,5 cm), leicht gezähnt und oval (Abbildung 25B). Die Kotyledonen von *tup4* unterscheiden sich nicht von WT Kotyledonen.

3.4.4.4 Blüte und Schotenentwicklung von *tup4*

Die Blüten der *tup4* Pflanzen zeigen keine sichtbaren Unterschiede zu WT Pflanzen. Die Blüten sind fertil und bilden nach ihrer Befruchtung im Vergleich zu WT verkürzte Schoten aus.

3.4.5 Phänotypische Beschreibung der *tup5* Mutante

Die *tup5* Pflanzen haben im Vergleich zu WT stark verkürzte Wurzeln, an denen nach ca. 6 Wochen Kalli entstehen. Auch am Hypokotyl wachsen Kalli aus. *tup5* Pflanzen bilden kleinere Blätter und kürzere Blütenprosse als WT Pflanzen.

3.4.5.1 Kallusbildung von *tup5* *in vitro*

Legt man Wurzel- und Hypokotylexplantate von *tup5* auf KS-Medium aus, entstehen nach ca. zehn Tagen gelbliche Kalli an den Verwundungsflächen (Abbildung 26A). Mit der Kallusbildung geht eine Verdickung des Wurzel- und Hypokotylgewebes einher. Der Kallus bleibt nicht auf die Verwundungsstellen beschränkt, sondern entwickelt sich auf dem ganzen Explantat. An den Wurzelexplantaten wachsen einzelne Wurzeln aus, an denen sich auch Kalli bilden können (Abbildung 26B). Die gelblichen Kalli kann man auf neues KS-Medium oder hormonfreies Medium umsetzen und weiterwachsen lassen. Der *tup5* Kallus zeigt Ähnlichkeiten zum *tup3* Kallus. So ist die Oberfläche auch mit kleinen, durchsichtigen, weißen Bläschen bedeckt, die z.T. sehr kurzen Wurzelhärchen ähneln. Das wuchernde Gewebe von *tup5* ist hart und mit einem Skalpell nur unter starkem Druck zu schneiden. Das Kallusgewebe von *tup5* war nicht in der Lage, wieder Sprosse auszubilden. Kallusgewebe das aus Hypokotylexplantaten ausgewachsen war, entwickelte keine Wurzeln (Abbildung 26A).

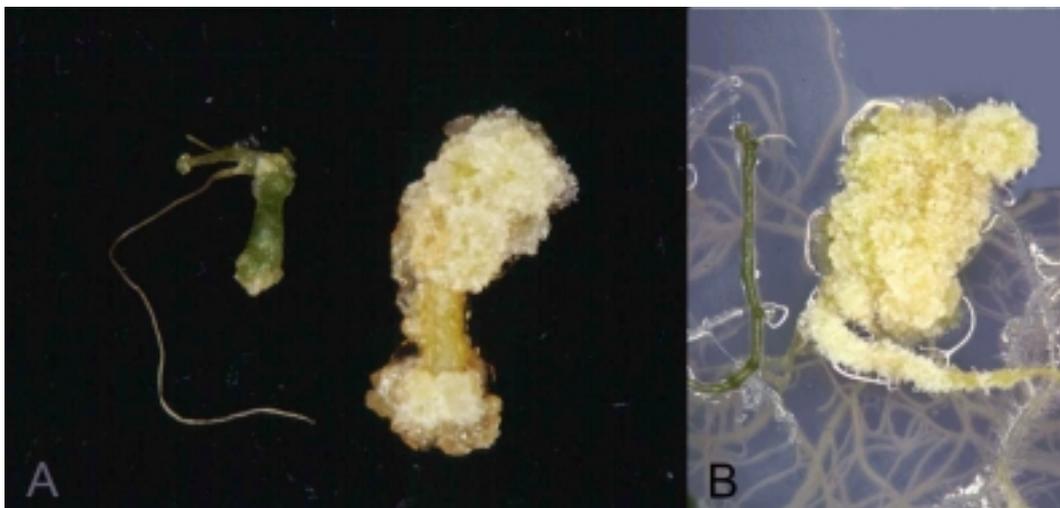


Abbildung 26: **A:** Hypokotylexplantat von WT (links) und *tup5* (rechts), 6 Wochen nach Kultivierung auf KS-Medium, **B:** Wurzelexplantat von WT (links) und *tup5* (rechts), 6 Wochen nach Kultivierung auf KS-Medium.

Bei *tup5* Pflanzen, die *in vitro* wachsen, kommt es nach ca. 6 Wochen zur spontanen Kallusbildung an der Wurzel, oder am Hypokotyl (Abbildung 27). Je nachdem, ob sich Kalli an Wurzel oder Hypokotyl bilden, entstehen verschiedene Kallusphänotypen. Beginnt das

Kalluswachstum an den Wurzeln, zeigen sich dort an vielen Stellen kleine, gelbliche Kalli (Abbildung 27C). Entwickelt sich das Kallusgewebe hingegen am Hypokotyl, hat der Kallus nach 8 Wochen das gesamte Hypokotyl und Teile der Wurzel ergriffen (Abbildung 27B). Bei *tup5* Pflanzen die auf Erde wachsen, wurde keine Kallusbildung an Hypokotyl oder Wurzel beobachtet.

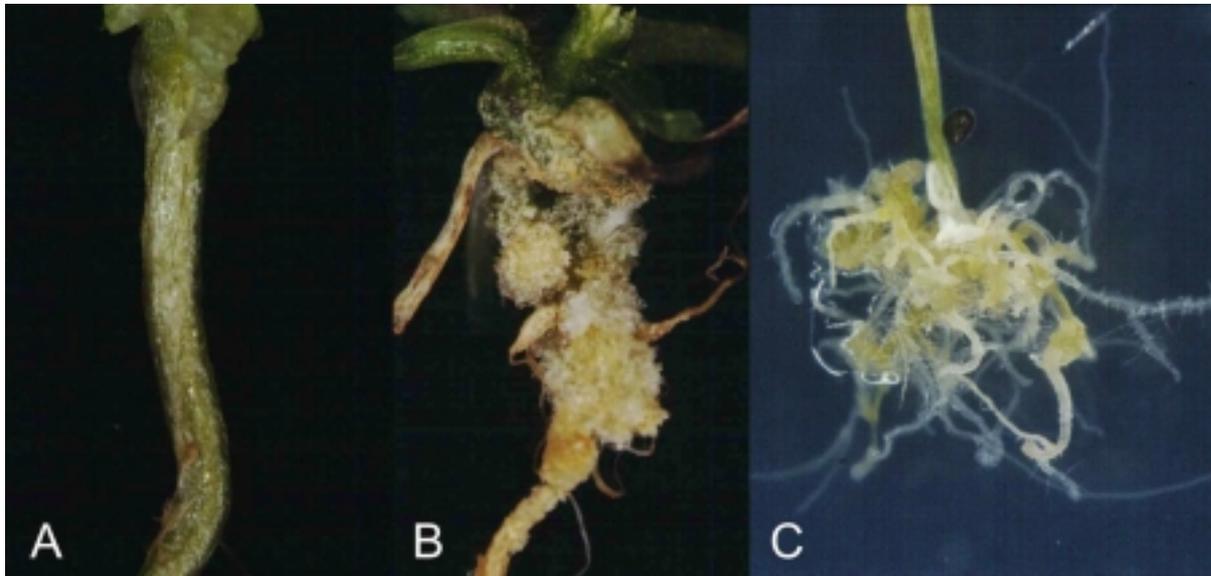


Abbildung 27: Spontane Kallusbildung an Wurzel und Hypokotyl von *tup5* Pflanzen bei Wachstum *in vitro*, **A:** Hypokotyl von WT Pflanze 8 wag, **B:** Hypokotyl von *tup5* Pflanze mit Kallus 8 wag, **C:** Wurzel von *tup5* 8 wag.

3.4.5.2 Pflanzenphänotyp von *tup5*

In vitro. ist die Wurzelbildung bei *tup5* Pflanzen stark beeinträchtigt. Nach 10 Tagen ist die Primärwurzel erst 1 - 2 mm lang (Abbildung 30). Zu diesem Zeitpunkt bilden sich auch schon Adventivwurzeln aus (Abbildung 28B). Diese Adventivwurzeln erreichen 8 Wochen nach Keimung eine Länge von höchstens 2 cm (Abbildung 27C). Adventivwurzeln von WT Pflanzen haben schon nach ca. 14 Tagen diese Länge erreicht (Daten nicht gezeigt).

Die Blätter entwickeln sich normal und sind auch noch von gleicher Größe wie beim WT. Das Sprossmeristem und Teile des Hypokotyls akkumulieren Anthocyane und sind daher rötlich gefärbt (Abbildung 28A,B). Nach vier Wochen sind die Blätter und die Blattrosette von *tup5* Pflanzen ca. 50% kleiner als bei WT Pflanzen (Abbildung 28C,D). Die Blattmorphologie der *tup5* Pflanzen ist jedoch, abgesehen von der Größe, nicht wesentlich verändert (Abbildung 28D). Der gesamte Habitus der *tup5* Pflanzen ist kleiner. So erreichen die Blütensprosse nur ca. 50% der Höhe von WT Pflanzen. Die Blütensprosse von *tup5* entwickeln sich zur gleichen Zeit wie bei WT Pflanzen. Die Blüten und Schoten der *tup5* Pflanzen zeigen keine auffallenden Unterschiede zu WT Pflanzen. Die Blüten sind fertil und bilden nach ihrer Befruchtung normale Schoten aus (Daten nicht gezeigt).

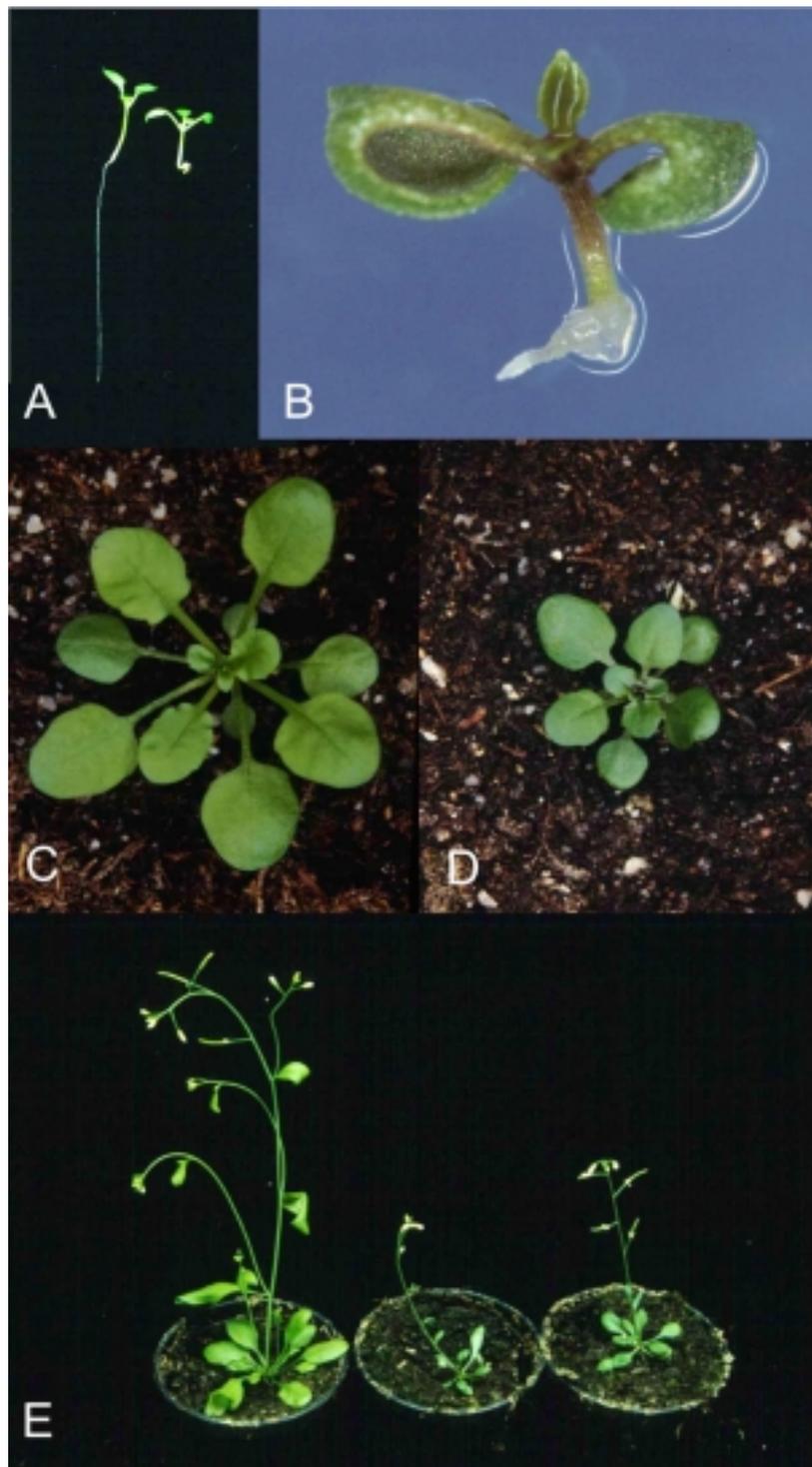


Abbildung 28: A: WT Pflanze (links) und tup5 Pflanze (rechts) 10 dag, B: tup5 Pflanze 10 dag, C: WT Pflanze 28 dag, D: tup5 Pflanze 28 dag, E: WT Pflanze (links) und zwei tup5 Pflanzen (rechts) 36 dag.

3.5 Vergleichende Analyse von Wachstumsparametern der *tup* Mutanten

3.5.1 Wachstumscharakteristika der Wurzeln

Das Wurzelwachstum der *tup* Mutanten wurde durch Messung mehrerer Parameter charakterisiert. Die Länge der Primärwurzel und des gesamten Wurzelsystems wurde gemessen, um Aufschluß über die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzel zu erhalten. Das Wurzelmeristem ist Ort der Zellteilung in der Wurzel und somit sind Veränderungen im Meristem von entscheidendem Einfluss auf die gesamte Wurzelentwicklung. Zur Beschreibung von Änderungen der Größe des Meristems wurden Länge und Breite des Meristems gemessen. Außerdem wurde die Ausbildung von Lateral- und Adventivwurzeln dokumentiert.

3.5.1.1 Wurzellängenwachstum

Um das Wurzellängenwachstum von WT und *tup* Mutanten zu bestimmen, wurden Samen auf MS-Medium ausgelegt und die heranwachsenden Keimlinge 10 Tage in senkrecht stehenden Petrischalen kultiviert. Zur Untersuchung des Lichteinflusses wurde ein Teil der Pflanzen 16 h pro Tag im Licht kultiviert (je 50 Pflanzen), und ein weiterer Teil ohne Licht kultiviert (je 35 Pflanzen). Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der Analyse des Wurzelwachstums unter Licht- und Dunkelbedingungen. Da *tup3* Mutanten vermehrt Lateral- und Adventivwurzeln im Dunkeln ausbildeten, wurden die Verteilung zusammen mit WT und *tup5* Mutanten nach vierwöchigem Wachstum im Dunkeln untersucht.

Die Wurzeln von WT Pflanzen erreichten unter Tag/Nacht-Bedingungen im Vergleich zu den *tup* Pflanzen die größte Länge. Alle *tup* Mutanten haben eine reduzierte Länge der Primärwurzel. *tup2* Wurzeln hatten eine Reduktion um 28%, *tup3* Wurzeln um 37% im Vergleich zu WT Wurzeln, allerdings mit großer Varianz. *tup5* bildete nur wenige Millimeter kurze Primärwurzeln aus. Diese Wurzeln erreichten nur 6% der WT Wurzellänge. Die Wurzeln von *tup1* wuchsen im Schnitt nur auf 27% der Wurzellänge von WT Pflanzen aus (Abbildung 29).

3.5.1.2 Wurzellänge bei Wachstum im Dunkeln

Pflanzen, die im Dunkeln keimen, bilden ein verlängertes Hypokotyl, einen Apikalhaken und eine verkürzte Wurzel aus (von Arnim und Deng 1996, Westhof und Klopstech 1996). Die cytokininüberproduzierende Mutante *amp1* hat ein verkürztes Hypokotyl und einen geöffneten Apikalhaken (Chaudbury et al. 1993). Auch durch exogene Cytokininapplikation kann der Deetiolierungsphänotyp partiell phänokopiert werden (Chin-Atkins et al. 1996). Deetiolierungsphänotypen können somit auf eine veränderte Cytokininkonzentration oder –sensitivität hinweisen. Wurzeln von *Arabidopsis* WT Pflanzen, die 10 Tage im Dunkeln gewachsen waren, erreichten nur 51% der Wurzellänge bei Wachstum unter Tag/Nacht Bedingungen (Abbildung 29). Wurzeln von *tup2* und *tup3* erreichten beim Wachstum im Dunkeln vergleichbare Wurzellängen wie WT Pflanzen. *tup1* Wurzeln zeigten bei Wachstum ohne Licht nur eine geringfügige stärkere Verkürzung (22,5%) als *tup1* Pflanzen, die unter Lichtbedingungen gewachsen waren. Bei *tup5* Pflanzen kam es bei Kultivierung ohne Licht zu einem verstärkten Wurzelwachstum. In Dunkelheit wuchsen die Wurzeln von *tup5* um 40% länger als WT Wurzeln unter den gleichen Lichtverhältnissen. Das Wurzelwachstum von *tup5* war im Dunkeln um den Faktor 11 höher als im Licht (Abbildung 29).

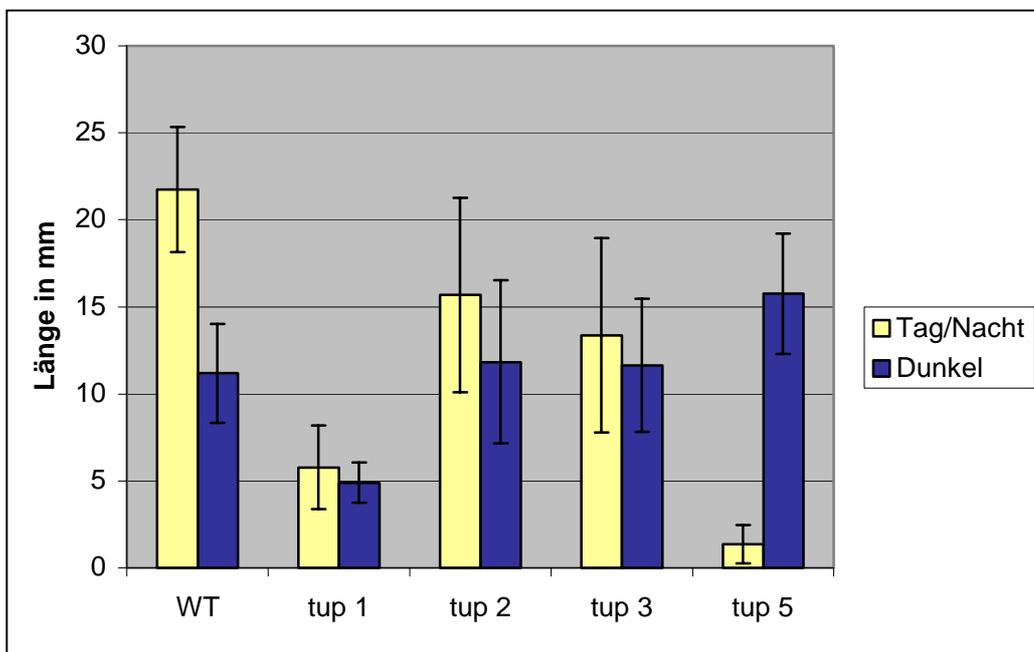


Abbildung 29: Wurzellänge von WT und *tup* Mutanten nach zehntägigem Wachstum *in vitro*, unter Tag/Nacht- oder Dunkelbedingungen. Probenzahl je 50 Pflanzen (Tag/Nacht), bzw. 35 Pflanzen (Dunkel).

3.5.1.3 Größe des Wurzelmeristems

Die Vermessung der Länge und Breite des Wurzelmeristems sollte Hinweis über die Größe der Zellpopulation des Wurzelmeristems geben. Mit Hilfe einer DAPI Färbung wurden die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar und so konnte die Region mit der höchsten Zellkerndichte in der Wurzelspitze identifiziert und vermessen werden. Die räumliche Ausdehnung des Wurzelmeristem von *tup2* in Länge und Breite war mit dem von WT Pflanzen vergleichbar. Dagegen spiegelten sich die sichtbaren morphologischen Veränderungen in den Wurzelspitzen von *tup1* (Abbildung 9B,D) und *tup5* (Abbildung 28B) auch in einer Verkürzung der Länge des Wurzelmeristems wider. Die Wurzelmeristemlänge von *tup1* war um 23% verringert, die von *tup5* sogar um 61% (Abbildung 30). Die Wurzelbreite auf Höhe des Meristems war jedoch nur bei *tup5* im Vergleich zu WT signifikant (um 26%) verringert (Abbildung 30).

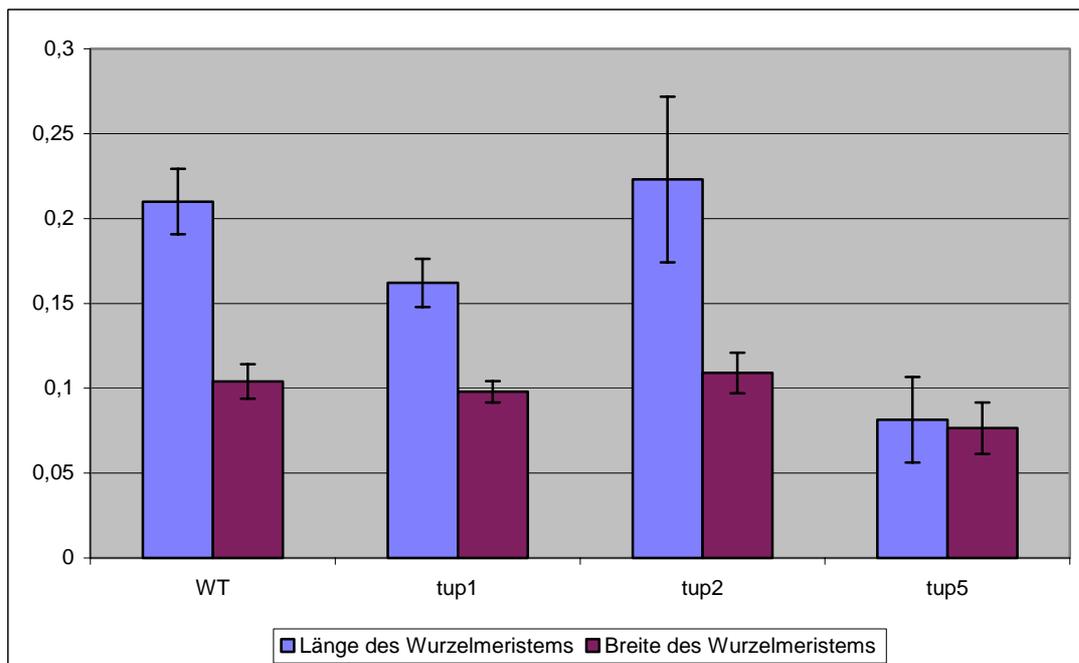


Abbildung 30: Länge und Breite der meristematischen Zone der Wurzel bei Wachstum im Licht, angefärbt mit DAPI. Gemessen wurde der Bereich der höchsten Zellkerndichte. Stichprobe waren jeweils 12 Primärwurzeln von WT und *tup* Pflanzen.

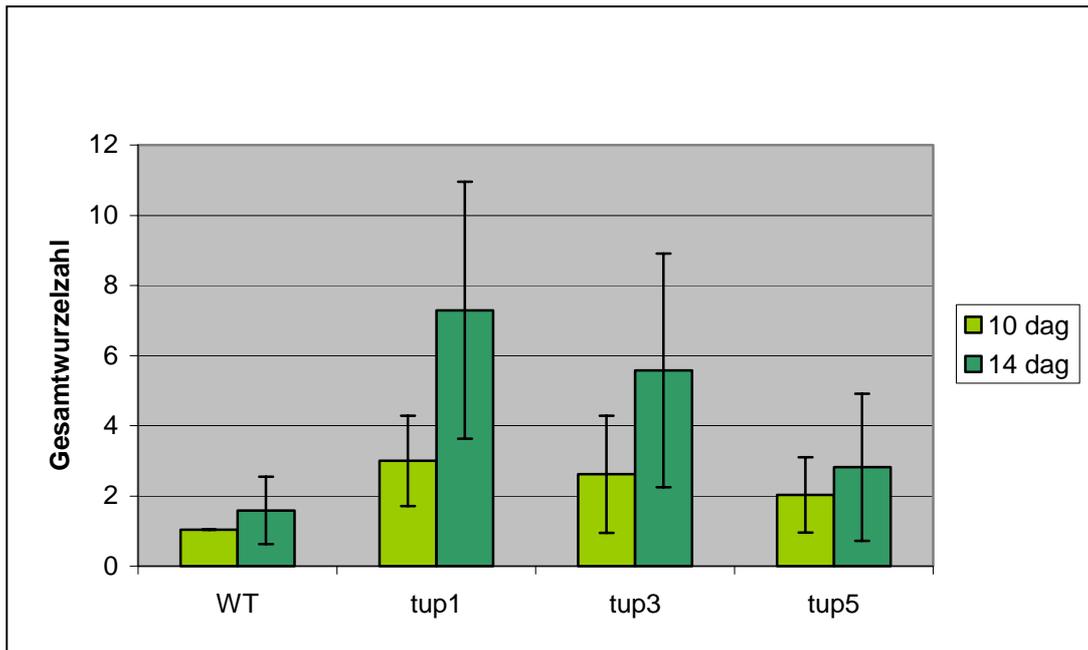


Abbildung 31: Anzahl aller Wurzeln des Gesamtwurzelsystems von WT und *tup* Mutanten 10 bzw. 14 Tage nach Keimung unter Tag/Nacht Bedingungen. Probenzahl jeweils 25 Pflanzen.

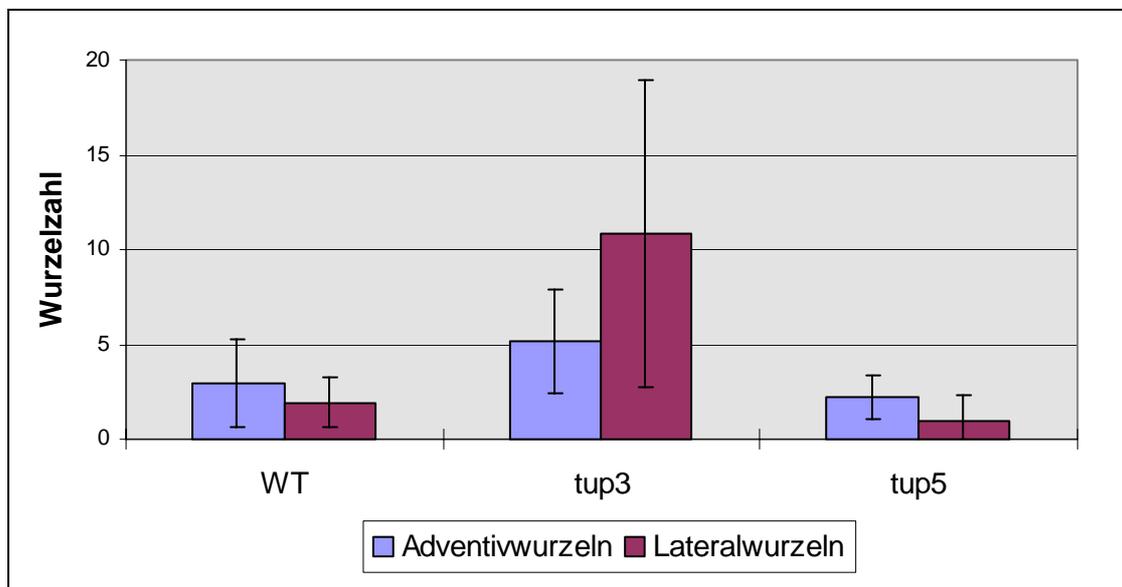


Abbildung 32: Adventiv- und Lateralwurzelzahl von WT, *tup3* und *tup5* Pflanzen nach vierwöchigem Wachstum *in vitro* im Dunkeln. Die Kulturschalen standen senkrecht. Stichprobe waren je 7 Pflanzen.

3.5.1.4 Lateral- und Adventivwurzeln

Lateral- und Adventivwurzeln werden bei WT Pflanzen frühestens 8 Tage nach Keimung gebildet (Schiefelbein und Somerville, 1990). Die Aufnahme der Gesamtzahl aller Wurzeln, der durchschnittlichen Länge des gesamten Wurzelsystems einer Pflanze und der Zahl der Lateral- und Adventivwurzeln zeigte, dass die *tup* Mutanten zum Teil große Abweichung bezüglich Anzahl und Entstehungszeitpunkt von Lateral- oder Adventivwurzeln aufwiesen. Diese Daten wurden von einer Stichprobe von jeweils 25 Pflanzen 10 und 14 Tage nach der Keimung und Wachstum im Licht/Dunkel-Rhythmus aufgenommen.

Die untersuchten *tup1*, *tup3* und *tup5* Mutanten hatten, im Gegensatz zu WT Pflanzen, neben der Primärwurzel schon mindestens eine weitere Wurzel im Gesamtwurzelsystem. 4 Tage später hatte sich der Unterschied der gebildeten Wurzeln bei den *tup* Mutanten noch vergrößert. WT Pflanzen entwickelten in 50% der Fälle eine einzige zusätzliche Wurzel (Standardabweichung $\pm 1,0$), während *tup1* im Schnitt $6,3 \pm 3,7$, *tup3* $4,6 \pm 3,3$ und *tup5* $1,8 \pm 1,2$ zusätzliche Wurzeln entwickelt hatten (Abbildung 33).

Nach zwei Wochen waren bei *tup1*, bzw. *tup3* schon $3,5 \pm 3,2$ bzw. $2,5 \pm 3,0$ weitere Lateralwurzeln entstanden. Die Entwicklung von Lateralwurzeln bei *tup5* Pflanzen nach 10 bzw. 14 Tagen verlief vergleichbar zu WT Pflanzen (Standardabweichung von WT: $\pm 0,9$; *tup5*: $\pm 1,3$).

Alle drei *tup* Mutanten hatten 10 Tage nach Keimung im Schnitt 1-1,5 Adventivwurzeln (Standardabweichung von WT: ± 0 ; *tup1*: $\pm 0,9$; *tup3*: $\pm 1,0$; *tup5*: $\pm 1,2$). Nach 4 weiteren Tagen hatte sich deren Anzahl um 0,2-0,8 Wurzeln je Pflanze erhöht (Standardabweichung von WT: $\pm 0,2$; *tup1*: $\pm 1,1$; *tup3*: $\pm 1,0$; *tup5*: $\pm 1,3$).

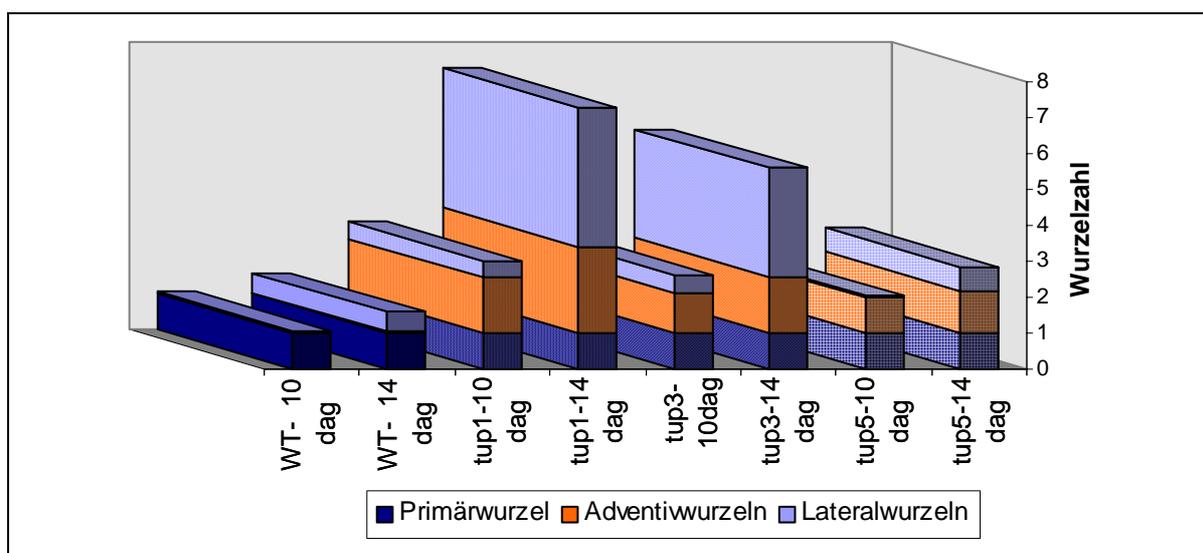


Abbildung 33: Anteil an Adventiv- und Lateralwurzeln am Gesamtwurzelsystems von WT und *tup* Mutanten 10 bzw. 14 Tage nach Keimung unter Tag/Nacht Bedingungen. Probenzahl jeweils 25 Pflanzen.

tup3 bildet sowohl unter Kulturbedingungen im Licht, als auch bei Wachstum im Dunkeln vermehrt Wurzeln aus. Nachdem die Pflanzen 4 Wochen im Dunkeln gewachsen waren, wurden Adventiv- und Lateralwurzeln bestimmt. WT Pflanzen bildeten im Dunkeln durchschnittlich insgesamt $6 \pm 1,9$ Wurzeln aus. Davon waren neben der Primärwurzel im Schnitt $3 \pm 2,3$ Adventivwurzeln und $2 \pm 1,3$ Lateralwurzeln. *tup3* hatte nach vierwöchigem Wachstum im Dunkeln durchschnittlich $17 \pm 6,7$ Wurzeln ausgebildet, dabei waren vor allem Lateralwurzeln ($10,8 \pm 8,1$) entstanden, aber auch die Anzahl der Adventivwurzeln lagen mit ca. $5,1 \pm 2,7$ Wurzeln über den Werten von WT Pflanzen. *tup5* zeigte im Dunkeln eine verringerte Wurzelzahl ($4,2 \pm 1,4$) im Vergleich mit WT Pflanzen. Dabei war sowohl die Anzahl von Adventiv- als auch von Lateralwurzeln im Vergleich zu WT Pflanzen im Dunkeln vermindert (Abbildung 32).

3.5.2 Blattzahl

Die Anzahl Blättern in der Blattrosette kann Aufschluss über retardiertes oder beschleunigtes Wachstum der Pflanze geben. 4 Wochen nach Keimung hatten WT Pflanzen durchschnittlich $12 \pm 1,4$ Blättern entwickelt. Im Vergleich dazu hatten *tup1* und *tup2* $9,5 \pm 0,6$ Blätter ausgebildet. *tup3* hingegen bildete im Schnitt $15 \pm 0,8$ Blätter aus. Bei *tup5* lag die Blattzahl mit $10,5 \pm 1,0$ etwas unter der Blattzahl von WT Pflanzen.

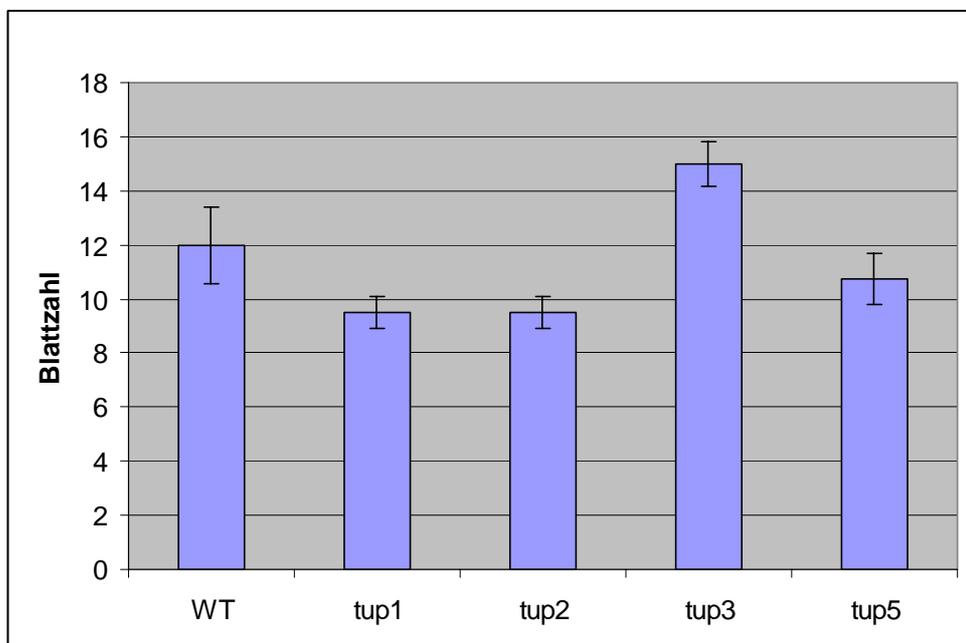


Abbildung 34: Anzahl der Blätter von WT und *tup* Pflanzen 4 Wochen nach Keimung. Stichprobe waren jeweils 15 Pflanzen.

3.5.3 Blühzeitpunkte

Um den Blühzeitpunkt zu bestimmen, wurden die WT und *tup* Pflanzen nach 5, 6,5, 8, 10 und 12 Wochen nach der Keimung auf die Ausbildung von Blüten sprossen untersucht. Als Blüten spross wurde eine Sprossachse mit mindestens einer reifen Blüte gewertet. *tup2* und *tup5* Mutanten hatten ähnliche Blühzeitpunkte wie WT Pflanzen, d.h. es hatten sich nach 5 Wochen schon bei 30 - 40% aller Pflanzen die vegetativen Meristeme in generative Meristeme umgewandelt (Abbildung 35). Nach 6,5 Wochen war dies schon bei über 70% der *tup2* und 82% der *tup5* Pflanzen der Fall (WT: 90%) und nach 8 Wochen hatten alle WT, *tup2* und *tup5* Pflanzen Blüten sprosse ausgebildet. Bei *tup1* und *tup3* begann die Blüten sprossinduktion in den ersten Pflanzen nach ca. 5,5 bzw. 7,5 Wochen. Erst nach 12 Wochen hatten alle *tup1* Pflanzen einen Blüten spross ausgebildet, wohingegen 10% der *tup3* Pflanzen dies noch immer nicht erreicht hatten. (Abbildung 35)

3.5.4 Hypokotylllänge bei Dunkelkeimung

Die Hypokotylllänge von WT und *tup* Pflanzen wurde 10 Tage nach Keimung im Dunkeln bestimmt. Bei *tup2* war die Hypokotylllänge im Vergleich zu WT Pflanzen um 35% und bei *tup3* um 50% reduziert. *tup1* und *tup5* zeigten im Vergleich zu WT Pflanzen nur geringfügige Abweichungen der Hypokotylllänge (Abbildung 36).

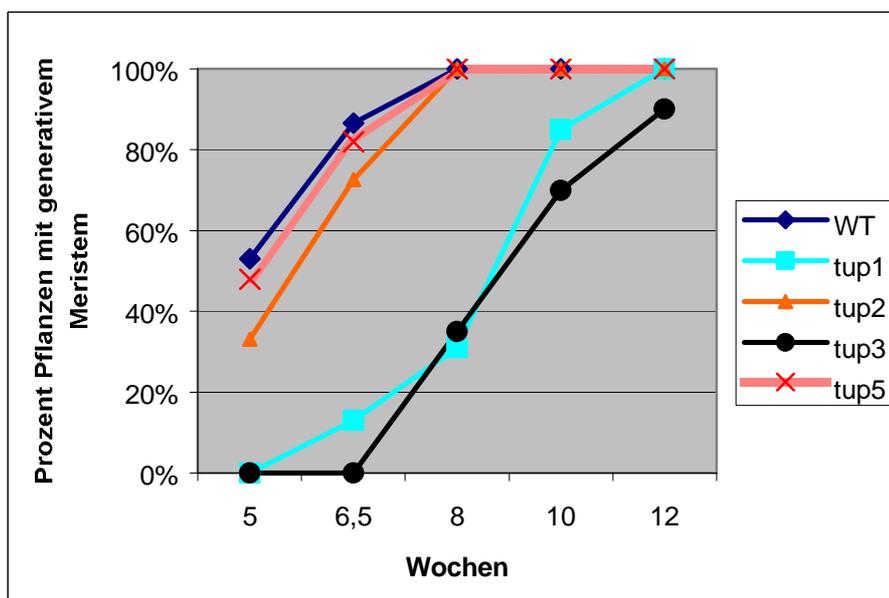


Abbildung 35: Anteil von WT und *tup* Pflanzen, die nach 5-12 Wochen mindestens eine reife Blüte entwickelt hatten. Es wurden jeweils ca. 15-30 Pflanzen getestet.

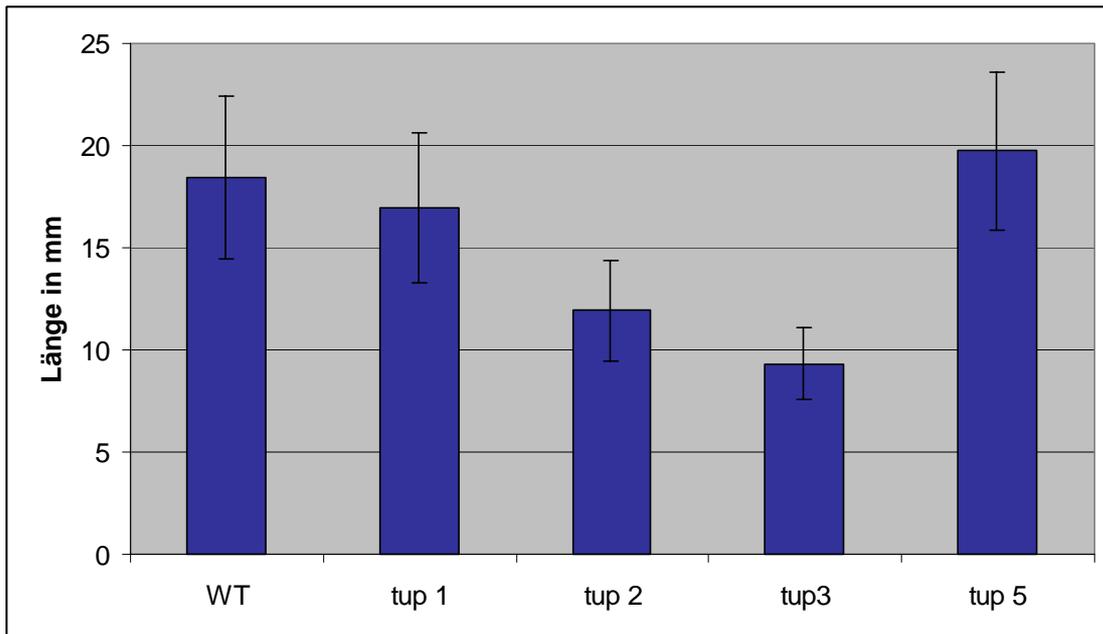


Abbildung 36: Hypokotyllänge von WT und *tup* Pflanzen nach 10 Tagen Wachstum im Dunkeln. Die Pflanzen wuchsen *in vitro* in senkrecht stehenden Petrischalen. Stichprobe je 40 Pflanzen.

3.6 Wirkung exogener Hormone auf *tup* Kalli und *tup* Keimlinge

Ziel des Kallusscreens war es, hormonsensitive, kallusbildende Mutanten zu finden. Um die Hormonsensitivität der gefundenen *tup* Mutanten genauer zu untersuchen, wurden *tup* Kalli und *tup* Pflanzen auf einer Cytokinin-Auxin-Hormonmatrix kultiviert und auftretende Veränderungen dokumentiert. Insbesondere konzentrierten sich die Beobachtungen auf die Gewichtszunahme und das Differenzierungsverhalten der Kalli, sowie auf phänotypische Veränderungen der *tup* Pflanzen.

Die *tup* Kalli wurden induziert, indem Wurzelexplantate 10 Tage alter *tup* Pflanzen zunächst 3 Wochen auf KS-Medium kultiviert wurden. Die entstandenen Kalli wurden dann auf einer Hormonmatrix 3 Wochen subkultiviert. Daraufhin wurden pro Rasterpunkt der Hormonmatrix jeweils 10 *tup* bzw. WT Explantate gewogen.

3.6.1 Einfluß von 2iP auf die Gewichtszunahme von *tup* Kalli

WT Explantate zeigten bei ansteigender Cytokininkonzentration (2iP, 0 - 0,5 mg/l) nur eine geringfügige Gewichtszunahme. Erst bei einer 2iP-Konzentration von 0,5 mg/l nahm das Gewicht der Kalli um den Faktor 3 zu (Abbildung 37).

Bei *tup1* Explantaten kommt es im Vergleich zu WT Explantaten bei einer 2iP-Konzentration von 0,05 und 0,2 mg/l und zugleich konstanter NAA Konzentration (0,05 mg/l) zu einer sechsfachen Erhöhung des Gewichts. Der Gewichtszuwachs ist ausschließlich auf die sich am Explantat bildenden Kalli zurückzuführen. Ist die 2iP-Konzentration im Medium noch höher (0,5 mg/l), so wird das Wachstum der Kalli gehemmt und das Gewicht der *tup1* Explantate liegt im Bereich von WT Explantaten (Abbildung 37).

tup2 Kalli hatten im Vergleich zu WT Explantaten durch die Ausbildung von Sprossen die größte Gewichtszunahme. Ist ein *tup2* Sprosskallus durch Kultivierung auf KS-Medium induziert, dann kann der Spross auch auf hormonfreiem Medium weiterwachsen. Das Wachstum wird jedoch auf 2iP/NAA Medium beschleunigt. Bei einer 2iP-Konzentration von 0,2 mg/l und 0,05 mg/l NAA im Medium kommt es zu einer verstärkten Sprosskallusbildung. Die Gewichtsdiﬀerenz der *tup2* Explantate im Vergleich zu WT Explantaten beträgt 400 mg/Kallus (Daten nicht gezeigt). Eine Erhöhung der 2iP-Konzentration auf 0,5 mg/l (bei konstanter NAA Konzentration von 0,05 mg/l) führt zu keiner Vergrößerung dieses Gewichtsunterschieds.

Das Startgewicht der *tup3* Explantate war nach Vorbehandlung (KS-Medium) zwar höher als bei WT, aber die Zunahme des Gewichts der *tup3* Explantate war bei zunehmender 2iP-Konzentration sehr gering. Die Gewichtskurve von *tup3* Explantaten verläuft annähernd parallel zur Gewichtskurve von WT Explantaten (Abbildung 37).

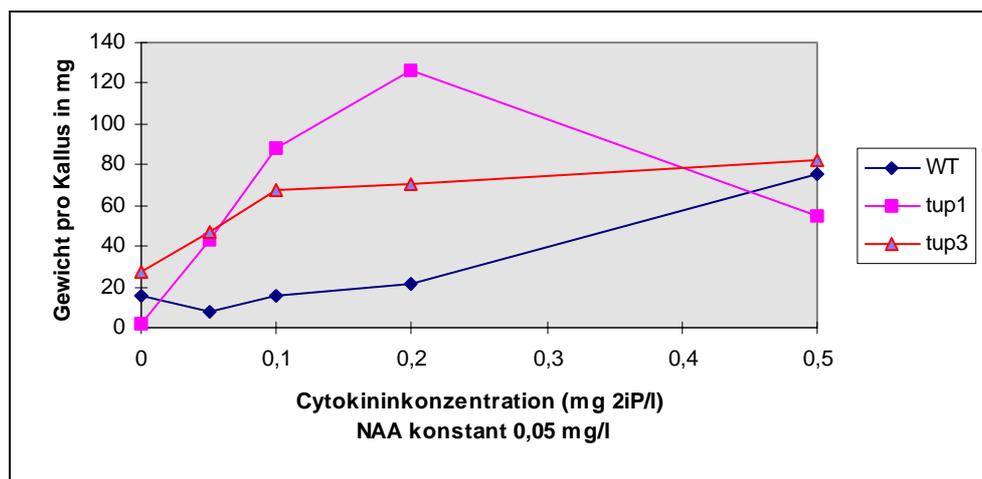


Abbildung 37: Gewicht der Wurzelkalli in Abhängigkeit von der Cytokininkonzentration (2iP) im Medium. Kalli wuchsen 3 Wochen auf KS-Medium und wurden dann 3 Wochen auf Medien mit verschiedenen Hormonkonzentrationen kultiviert.

3.6.2 Einfluß exogener Hormone auf das Differenzierungsverhalten von *tup* Kalli

An den Wurzelexplantaten von WT Pflanzen hatten sich nach vierwöchiger Kultivierung auf hormonfreiem Medium einzelne Wurzeln gebildet. Bei Zugabe von 2iP ins Medium wuchs die Primärwurzel weiter, es bildeten sich aber weder neue Wurzeln noch Sprosse. Dagegen führte eine NAA-Konzentration von 0,1 mg/l im Medium zu einer verstärkten Wurzelbildung. Bei noch höheren NAA-Konzentrationen (0,25 und 1 mg/l) entstanden am Explantat Kalli, die mit vielen kurzen Wurzeln übersät waren (Tabelle 7 und Abschnitt 3.1.2 Hormonmatrix). Zur Ausbildung eines Sprosses kam es nur bei mittleren bis hohen 2iP-Konzentrationen (0,25 und 1 mg/l) und gleichzeitig mittleren NAA-Konzentrationen (0,1 und 0,25 mg/l) im Medium. Bei einem ausgeglichenen Cytokinin/Auxin-Konzentrationsverhältnis wurden hingegen immer Wurzeln gebildet.

Die Kalli an den *tup1* Wurzelexplantaten zeigten im Vergleich zu WT Explantaten eine geringe Tendenz zur Differenzierung des Kallusgewebes. Die vermehrte Ausbildung von Wurzeln, die bei WT bei exogener Applikation von Auxin auftrat, gelang nur bei der höchsten verwendeten NAA-Konzentration (1mg/l NAA). Zusätzliches Cytokinin verringerte (0,05 mg/l) oder unterdrückte (0,25 mg/l) die Ausbildung von Wurzeln (Tabelle 7).

An *tup2* Wurzelexplantaten entstanden bei nahezu allen Hormonkombinationen Sprosse. Ausnahmen waren das hormonfreie Kontrollmedium, Medien mit niedriger NAA-Konzentration (0,1 mg/l) oder mit mittlerer 2iP-Konzentration (bis 0,25 mg/l). Eine Kombination von NAA und 2iP im Medium führt schon bei einer mehr als fünffach geringeren Konzentration (NAA und 2iP je 0,1 mg/l) als die jeweiligen einzelnen Hormone zur Entwicklung von Sprossen. Zusätzliche Wurzeln bilden sich an den Wurzelexplantaten im Vergleich zu WT-Explantaten erst bei einer NAA-Konzentration von 0,25 mg/l (WT bei 0,1 mg/l) und dann auch nur in verringertem Maße (Tabelle 7).

tup3 Kalli waren weder auf hormonfreiem Medium noch auf Medien mit verschiedenen NAA- und 2iP-Konzentrationen in der Lage, Sprosse auszubilden. Im Gegensatz dazu kam es bei fast allen Kombinationen von NAA und 2iP zur Wurzelbildung an den *tup3* Kalli. 2iP alleine führte zu einer Reduktion der Wurzelbildung, die ab einer 2iP-Konzentration von 0,25 mg/l komplett unterdrückt wurde. Diese Hemmung der Wurzelformation trat nicht auf, wenn gleichzeitig mindestens 0,1 mg/l NAA im Medium waren (Tabelle 7).

Die *tup5* Mutanten zeigten hinsichtlich der Differenzierung eine verringerte 2iP- und NAA-Sensitivität (Tabelle 7). So bildeten sich erst ab einer NAA-Konzentration von 0,25 mg/l erste Wurzeln aus. Eine Kombination von NAA und 2iP führte nur in einem Fall zu einer Sprossbildung (bei 1 mg/l 2iP und 0,1 mg/l NAA) .

Tabelle 7: Differenzierungsverhalten von WT, *tup1*, *tup2*, *tup3* und *tup5* Wurzelexplantaten auf einer Cytokinin/Auxin-Hormonmatrix. Waagrecht sind die 2iP-, senkrecht die NAA-Konzentrationen aufgetragen. 3 Wochen nach Subkultivierung der Wurzelexplantate auf der Hormonmatrix wurden anhand von jeweils 10 Explantaten die phänotypischen Veränderung untersucht. Legende: o = keine Differenzierung, (r) = einzelne, kurze Wurzel, r = mehrere Wurzeln, R = viele Wurzeln, (s) = einzelnes Blättchen, s = kleine Sprosse, S = große Sprosse, X = Keine Ergebnisse vorliegend.

1	R	R	R	R
0,25	R	r	o	rs
0,1	r	o	r	S
0	(r)	o	o	o
	0	0,1	0,25	1
<i>WT Kontrolle</i>				

1	r	(r)	-	(r)
0,25	o	o	o	o
0,1	o	o	o (s)	o
0	o	o	o	o
	0	0,1	0,25	1
<i>tup1</i>				

1	sr	sr	sr	s
0,25	s	Sr	S(r)	S
0,1	o	s	S	S
0	-	-	-	S
	0	0,1	0,25	1
<i>tup2</i>				

1	R	R	R	R
0,25	R	r	r	r
0,1	R	r	r	o
0	R	(r)	-	-
	0	0,1	0,25	1
<i>tup3</i>				

1	R	-	X	X
0,25	(r)	-	-	X
0,1	-	-	-	(s)
0	-	-	-	(s)
	0	0,1	0,25	1
<i>tup5</i>				

3.6.3 Einfluß exogener Hormone auf *tup* Keimlinge

Um den Einfluß exogener Hormone auf *tup* Keimlinge zu untersuchen wurden homozygote Samen von *tup1*, *tup2*, *tup3* und *tup5* auf Medien mit hoher Cytokinin- und Auxinkonzentration (jeweils 1 mg/l) ausgelegt. Die Pflanzen wurden nach zweiwöchigem Wachstum auf phänotypische Unterschiede zu WT Pflanzen untersucht. Die phänotypischen Unterschiede wurden nicht quantifiziert, sondern nur die aufgetretenen Phänotypen beschrieben, da die Stichprobe jeweils nur ca. 5 Keimlinge betrug. Die Versuche können jedoch erste Hinweise auf eine veränderte Sensitivität der *tup* Mutanten geben.

Einfluss exogener Hormone auf *tup1* Keimlinge

Das Wurzelwachstum von *tup1* Keimlinge war durch eine 2iP-Cytokininkonzentration von 1 mg/l vollständig unterbunden. Stattdessen bildete sich ein grüner Kallus (Durchmesser 2-3 mm) aus. Im Vergleich dazu waren WT Pflanzen in der Lage, eine 1-1,5 cm lange Wurzel auszubilden. Es gab keine sichtbaren Unterschiede in der Sprossbildung bei WT und *tup1* Pflanzen nach exogener Applikation von 2iP (Daten nicht gezeigt).

Eine exogene NAA-Konzentration von 1 mg/l führte bei WT Pflanzen zu einer Reduktion der Wurzellänge und einer Erhöhung der Wurzelzahl. Im Gegensatz dazu bildete sich am Wurzelhals von *tup1* Mutanten ein Kallus mit 2-3 mm Durchmesser aus. Die Sprossentwicklung blieb sowohl bei WT als auch bei *tup1* auf die Ausbildung von Keimblättern beschränkt.

Einfluß exogener Hormone auf *tup2* und *tup5* Keimlinge

Es wurden keine Unterschiede in der Reaktion auf exogene Cytokinin-, bzw. Auxinkonzentration (1 mg/l NAA, bzw. 2iP) im Vergleich mit WT Pflanzen gefunden.

Einfluß exogener Hormone auf *tup3* Keimlinge

Bei einer 2iP-Konzentration von 1 mg/l entstanden bei *tup3* Pflanzen kleine Kalli (Durchmesser 1-2 mm) am Wurzelhals. Auf hormonfreiem Medium hatten *tup3* Pflanzen zu diesem Zeitpunkt noch keinen Kallus ausgebildet. Eine hohe NAA-Konzentration (1 mg/l) führte zu einem vergleichbaren Effekt, wie er bei WT Pflanzen beobachtet wurde, nämlich zu einer Verkürzung der Wurzeln und stattdessen zu einer vermehrten Wurzelbildung.

3.7 Expression von Markergenen

Außer den Analysen endogener Hormonkonzentrationen können Reporteranalysen erste Hinweise auf eine veränderte endogene Hormonkonzentration oder eine veränderte Hormonantwort geben. Unter Verwendung eines Promotor-*GUS*-Konstrukts eines *early response* Gens für Cytokinin (*ARR5*, Brandstatter und Kieber, 1998; Imamura et al., 1998; D'Agostino et al., 2000) und eines Promotor-*GUS*-Konstrukts mit einem synthetischen *auxin response element* (*DR5::GUS*; Sabatini et al. 2000) wurde untersucht, ob WT und *tup* Pflanzen unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Des Weiteren wurden Promotor-*GUS*-Konstrukte von Genen, die an Zellteilung (*CycB1::GUS*; Colón-Carmona et al. 1999) oder Differenzierungsvorgängen (*KNAT1::GUS*; Ori et al. 1999) beteiligt sind, auf ihr Expressionsverhalten in *tup* Mutanten untersucht. Die Konstrukte wurden durch Kreuzung in die *tup* Linien eingebracht und die F2 Generation dieser Kreuzungen analysiert. Im folgenden werden Ergebnisse für die vergleichende Analyse der Genexpression im *tup1*-Hintergrund und die Expression von *ARR5* im *tup2*- und *tup3*-Hintergrund dargestellt

3.7.1 Expression eines *early response* Gens der Cytokinine (*ARR5*) in *tup1*

Brandstatter und Kieber (1998) konnten zeigen, dass die mRNA Konzentration von *IBC6/ARR5* in etiolierten Keimlingen 10 min nach Applikation von Cytokinin um den Faktor 2,5 und nach 30 min um den Faktor 8 anstieg. Da die erhöhte Expression unabhängig von einer *de novo* Proteinsynthese und zudem spezifisch für Cytokinine war, folgerten sie, dass es sich um ein *primary response* Gen der Cytokinine handelt. *ARR5* weist eine hohe Homologie zu *Response Regulatoren* des Zweikomponentensystems von Bakterien auf. Imamura et al (1998) zeigten *in vivo* und *in vitro*, dass *ARR5* die Übertragung des Phosphorylrestes in einem Zweikomponentensystem katalysieren kann. Eine veränderte Expression von *ARR5/IBC6* kann als ein erster Hinweis auf eine veränderte Cytokininkonzentration oder Signaltransduktion in der Pflanze gewertet werden.

In 5 Tage alten WT Keimlingen ist eine Promotor-abhängige *ARR5::GUS*-Aktivität in der Wurzelspitze (Abbildung 38A), im Vaskularsystem der ganzen Pflanze, dem Sprossmeristem (Abbildung 38C), sowie den Blättern sichtbar. Nach 15 Tagen zeigt sich die Expression wesentlich abgeschwächt im apikalen Teil des Wurzelmeristems, dem Vaskularsystem der Wurzel (Daten nicht gezeigt) und im Sprossmeristem.

tup1 Keimlinge haben 5 Tage nach Keimung, mit Ausnahme der Expression in der Wurzel und im Sprossmeristem (Abbildung 38CD), ein mit WT vergleichbares Expressionsmuster. Im Wurzelmeristem von *tup1* wird *ARR5* schwächer exprimiert (Abbildung 38B). Nach 15 Tagen ist, im Unterschied zu WT, in der Primärwurzel von *tup1* keine *ARR5*-Promotor-

abhängige GUS-Aktivität mehr zu finden (Daten nicht gezeigt). Sekundärwurzeln von *tup1* haben jedoch eine Expression in der Wurzelspitze und in Teilen des Vaskularsystems (Daten nicht gezeigt).

In WT Kalli (induziert durch exogene Applikation von je 0,1 mg/l 2iP und NAA) war die *ARR5*-Expression auf wenige einzelne Zellen beschränkt, während alle Zellen des *tup1* Kalli (auf KS-Medium gewachsen) eine *ARR5*-Expression zeigten (Abbildung 38E,F). In frühen Stadien der *tup1* Kallusentwicklung konnte durch die GUS-Färbung das Ablösen einzelner Zellen sichtbar gemacht werden (Abbildung 38G).

3.7.2 Expression von *DR5::GUS* in *tup1*

Die auxinsensitive *DR5*-vermittelte GUS-Aktivität ist in WT Pflanzen 15 Tage nach Keimung in der Wurzelspitze (Abbildung 38H), sowie im Vaskularsystem der Wurzel und teilweise in Blättern zu sehen (Daten nicht gezeigt). Blätter und Primär- sowie Sekundärwurzeln von *tup1* zeigen diese Expression in vergleichbarem Maße wie WT (Abbildung 38I,K).

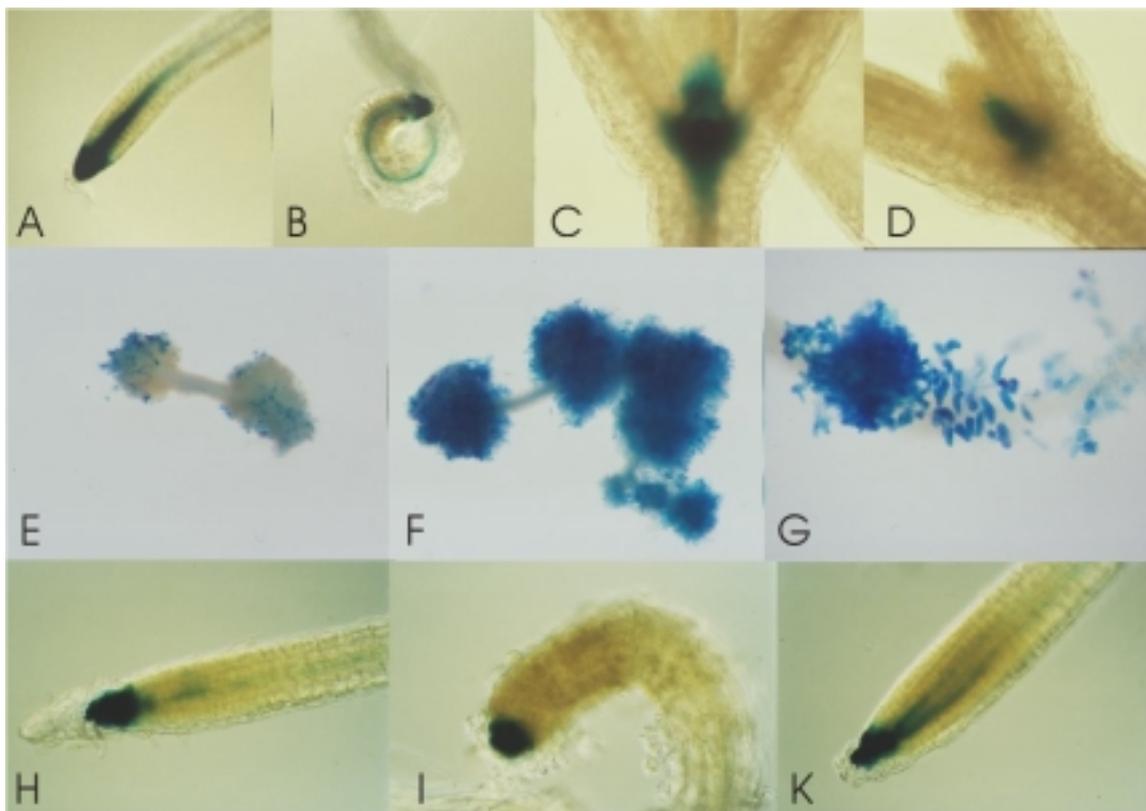


Abbildung 38: Promotoraktivität von *ARR5* (A-G) und *DR5* (H-K) in 5 bzw 15 Tage alten Keimlingen des Wildtyps und der Mutante *tup1*. **A:** WT Pflanzen mit starker *ARR5*-Expression in der Wurzelspitze, 5 dag und **B:** reduzierte Expression in *tup1* Wurzelspitzen, 5 dag. **C:** Expression von *ARR5::GUS* im Sprossmeristem von WT und **D:** *tup1*, 5 dag. **E:** Schwache Expression in WT Kallus 4 Wochen nach Subkultivierung auf doppeltem KS-Medium (0,1 mg/l NAA und 2iP) und **F:** starke Expression in *tup1* Kallus, 4 Wochen nach Subkultivierung auf KS-Medium. **G:** Früher Zeitpunkt der Kallusentstehung an *tup1* Wurzelexplantaten (*ARR5::GUS*-Expression). **H:** *DR5*-Expression in 15 Tage alter WT Wurzel, **I:** *tup1* Primärwurzel, **K:** *tup1* Sekundärwurzel.

3.7.3 *KNAT1*-Expression in *tup1* Pflanzen und Kalli

Das Homöoboxgen *KNAT1* spielt eine wichtige Rolle bei Initiierung und Erhaltung des Sprossmeristems (Kerstetter und Hake, 1997). Außerdem hat *KNAT1* möglicherweise eine Rolle bei der Cytokininsynthese bzw. wird selber durch Cytokinin reguliert (Ori et al., 1999; Rupp et al., 1999).

Nach 7 Tagen ist bei WT und *tup1* Pflanzen eine vergleichbare *KNAT1*-abhängige GUS-Aktivität im Sprossmeristem und im Vaskularsystem der Wurzel sichtbar (Daten nicht gezeigt). *KNAT1::GUS* wird in Wurzelexplantaten von WT und *tup1* exprimiert in *tup1* Kalli allerdings stärker als im WT (Abbildung 39A,B).

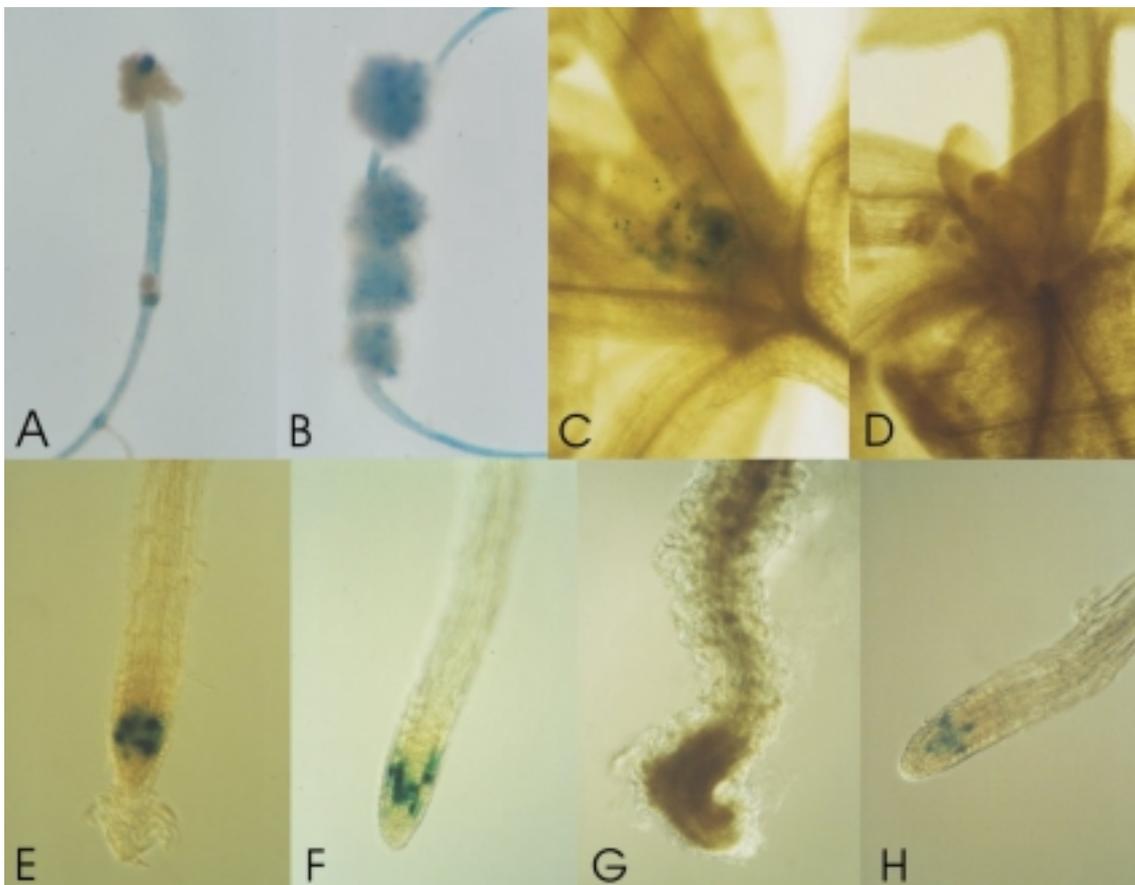


Abbildung 39: *KNAT1::GUS* (A,B) und *CycB1::GUS* Expression (C-H) in WT und *tup1* Explantaten bzw. Pflanzen. **A:** WT Wurzelexplantat und **B:** *tup1* Wurzelexplantat jeweils auf KS-Medium 4 Wochen nach Subkultivierung. **C:** Sprossmeristem (15 dag) von WT und **D:** *tup1* Pflanze. *CycB1::GUS*-Expression in **E:** WT Primärwurzel, **F:** WT Sekundärwurzel, **G:** *tup1* Primärwurzel und **H:** *tup1* Sekundärwurzel. Wurzeln in **E-H** sind 15 Tage alt.

3.7.4 *CycB1*-Expression in *tup1* Pflanzen und Kalli

Der Zellzyklus wird in Eukaryoten unter anderem durch Proteinkomplexe, die aus einem Cyclin und einer cyclinabhängigen Kinase (Cdc2) bestehen, reguliert. Die Cdc2/CycB1-Komplexe haben bei der G2/M-Transition eine zentrale Funktion (Hemerly et al. 1994). Die Expression von *CycB1* ist in Pflanzen auf sich teilendes Gewebe in Meristemen beschränkt (Ferreira et al. 1994). Colón-Carmona et al. (1999) konstruierten ein modifiziertes *CycB1::GUS*-Gen (*FA4C*), bei dem vor dem *GUS*-Gen eine „*destruction box*“ lokalisiert ist, wodurch der Abbau des GUS-Proteins zellzyklusabhängig vermittelt wird. Daher akkumuliert das GUS-Protein in den Zellen nicht und es werden nur aktuelle Zellteilungen sichtbar gemacht.

In 15 Tage alten WT Pflanzen wurde die Expression von *CycB1::GUS* in einzelnen Zellen des Spross- und Wurzelmeristems beobachtet (Abbildung 39C-F). In *tup1* Meristemen trat eine verringerte Anzahl von Zellen mit *CycB1*-Promotor-vermittelter GUS-Aktivität vor allem im Spross und in der Primärwurzel auf. Die Sekundärwurzel von *tup1* hatte eine mit WT vergleichbare Anzahl exprimierender Zellen im Meristem (Abbildung 39H).

3.7.5 Expression eines *early response* Gens für Cytokinine (*ARR5*) in *tup2*

Die Expression von *ARR5::GUS* wurde nur an Wurzelexplantaten von *tup2* untersucht, die 4 Wochen auf KS-Medium subkultiviert worden waren. Dabei konnte eine GUS-Färbung vornehmlich in den Sprossmeristemen beobachtet werden, die aus den Kalli auswuchsen. Die Kalli selbst zeigten nahezu keine Expression. In jungen Blättern wurde *ARR5* allein in den Blattvenen, in älteren Blättern überhaupt nicht exprimiert (Abbildung 40A,B).

3.7.6 Expression eines *early response* Gens für Cytokinine (*ARR5*) in *tup3*

tup3 Pflanzen hatten 15 Tage nach Keimung eine mit WT vergleichbare *ARR5*-Promotor-vermittelte GUS-Aktivität (Daten nicht gezeigt). *tup3* Kalli, die auf KS-Medium 4 Wochen subkultiviert worden waren, hatten eine hohe *ARR5*-Expression in Kallus- und Vaskulargewebe (Abbildung 40C,D). Die äußersten Zellschichten zeigten keine Expression, sondern waren gelblich gefärbt. Diese äußersten Zellschichten hatten z.T. Risse in der Oberfläche. An den inneren Zellschichten lösten sich, ähnlich wie bei *tup1* Kalli (Abbildung 38G), einzelne Zellen vom Zellverband (Abbildung 40 CD).

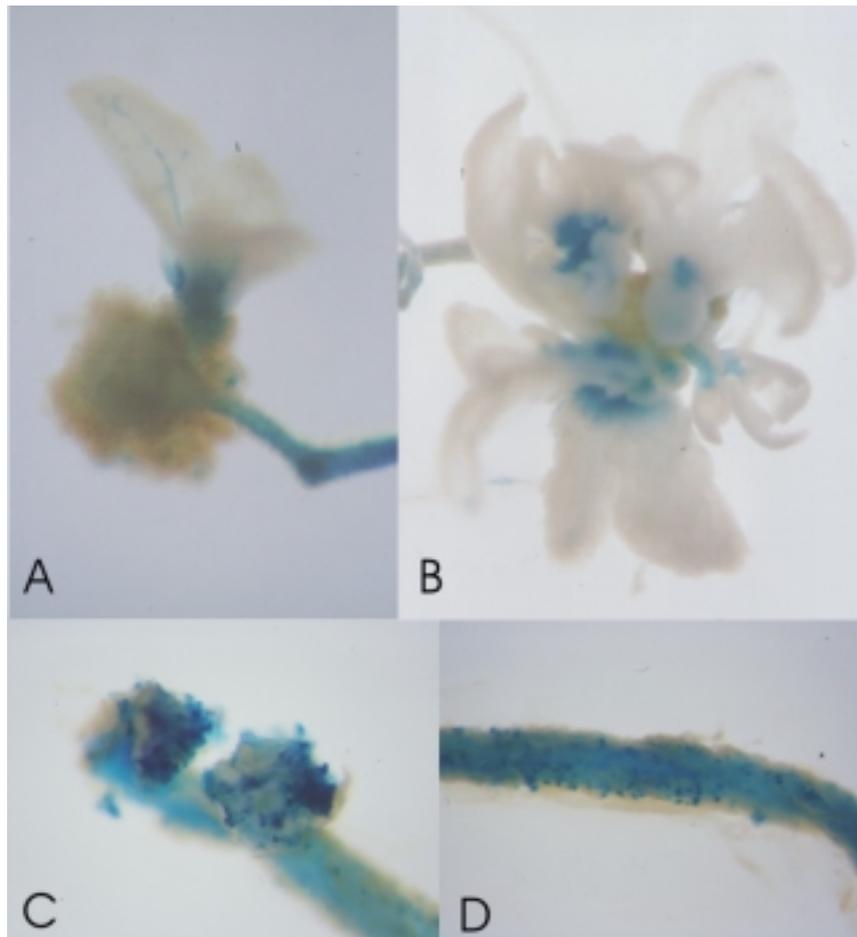


Abbildung 40: Promotoraktivität von *ARR5* in *tup2* (A,B) und *tup3* (C,D) Wurzelexplantaten 4 Wochen nach Subkultivierung auf KS-Medium. **A:** *tup2* Kallus mit auswachsendem Spross, frühes Stadium, **B:** *tup2* Sprosse, aus Wurzelexplantat ausgewachsen, spätes Stadium, **C:** *tup3* Kallus und **D:** *tup3* Wurzelexplantat mit hoher *ARR5*-Promotor-abhängiger GUS-Aktivität.

3.8 Phänotypische und genetische Charakterisierung der *asm* Mutanten

3.8.1 Beschreibung des *asm* Phänotyps

Die *asm* Mutanten wurden im Rahmen des Kallusscreens identifiziert. In allen Fällen handelte es sich um rezessive Mutationen (Daten nicht gezeigt). Sprossmeristemexplantate von allen *asm* Mutanten zeigten im Vergleich zu WT auf KS-Medium ein verändertes Wachstum. Das apikale Meristem bildete entweder ein kallusartiges Gewebe mit blattartigen Strukturen aus oder es kam zu einer vermehrten Blattbildung des Sprossmeristem. Auch auf hormonfreiem Medium formierte das apikale Sprossmeristem von *asm2* und *asm4* Pflanzen vermehrt Blätter, während sich das Meristem bei *asm1* und *asm3* Pflanzen zu einem proliferierenden Kallus entwickelte.

3.8.1.1 Phänotypische Beschreibung der *asm1* Mutante

Die *asm1* Mutanten unterscheiden sich schon wenige Tage nach der Keimung von WT Keimlingen durch ihr verkürztes Hypokotyl und das verringerte Wurzelwachstum. Die Kotyledonen zeigen die ersten 8 - 10 Tage keine sichtbaren Unterschiede zu WT Keimlingen. Nach ca. 10 Tagen nekrotisieren Wurzel und Keimblätter. Am Sprossmeristem bildet sich nach ungefähr zwei Wochen kallusartiges Gewebe aus, welches mit blattartigen Strukturen durchsetzt ist (Abbildung 41A). Der Kallus kann auf hormonfreiem Medium praktisch unbegrenzt weiter kultiviert werden. Auf Erde sind die *asm1* Mutanten nicht lebensfähig. Die *asm1* Mutanten zeigten einen ähnlichen Phänotyp, wie die von Frank (1999) beschriebenen *tsd1* Mutanten.

3.8.1.2 Phänotypische Beschreibung der *asm2* Mutante

Die frühe Keimlingsentwicklung der *asm2* Mutanten verläuft ähnlich wie bei WT Pflanzen. Kotyledonen und Wurzeln sind normal ausgebildet. Das Hypokotyl ist jedoch im Vergleich zu WT Pflanzen verkürzt. Die Epinastie der Blätter nimmt sukzessive zu, so dass nach zwei Wochen alle Blätter stark eingekrümmt sind. Auch alle Folgeblätter zeigen diese Epinastie. Die Blätter von *asm2* Mutanten sind von deutlich hellerem Grün als WT Pflanzen und wirken ausgebleicht. Die Blattform der *asm2* Mutanten ist stark verändert. Die Blätter sind nicht rund oder oval wie WT Blätter, sondern schmal, langgestreckt und spitz zulaufend. Nur ein Teil der Blätter bildet noch eine Blattspreite mit gezackten Rändern aus. Außerdem sind die Blattränder nach unten eingerollt. Die Anordnung der ersten 10 Blätter der jungen *asm2* Pflanzen entspricht erkennbar der spiraligen Phyllotaxie des Wildtyps (Abbildung 41B). Die Blätter von *asm2* Mutanten bleiben kleiner als WT Blätter und die Pflanzen haben 8 Wochen

nach Keimung noch keine Blütensprosse ausgebildet, was im Ergebnis *in vitro* zu kleinen kompakten Sprossen führt. Die spirale Anordnung der Blätter ist nicht mehr zu erkennen (Abbildung 41C).

asm2 Mutanten bilden mehr Adventiv- und Lateralwurzeln aus. Die Wurzeln sind jedoch im Vergleich zu WT Wurzeln stark verkürzt und auch nach zwei Monaten nicht länger als 3-4 cm. Beim Wachstum des apikalen Sprosses auf KS-Medium kam es zur Ausbildung von Kalli mit lanzettlichen blattartigen Strukturen (Abbildung 41G). Die Blatt-, Hypokotyl- und Wurzelexplantate bildeten auf KS-Medium vermehrt Wurzeln. Diese Wurzelbildung wird in Abbildung 41H exemplarisch anhand eines Blattexplantats gezeigt.

3.8.1.3 Phänotypische Beschreibung der *asm3* Mutante

Die *asm3* Mutanten zeigen schon 5 Tage nach Keimung deutliche Unterschiede zu WT Keimlingen bei Wachstum auf hormonfreiem Medium. Die Kotyledonen sind gelb, haben verkürzte Petiolen und sind kleiner als WT Kotyledonen. Des Weiteren ist das Hypokotyl verkürzt und verdickt. Nach ca. 10 Tagen bildet sich am Sprossmeristem kallusartiges Gewebe mit blattartigen Strukturen aus. 4 Wochen nach Keimung hat der Kallus das gesamte Hypokotyl, die Kotyledonen und das Sprossmeristem überwuchert (Abbildung 41D). Die Wurzelentwicklung von *asm3* Mutanten ist im Vergleich zu WT Pflanzen nicht sichtbar gestört. Abbildung 41F zeigt den *in vitro* Phänotyp der Meristemexplantate von *asm3* und WT Pflanzen.

3.8.1.4 Phänotypische Beschreibung der *asm4* Mutante

Von den *asm4* Mutanten wurden nur 4 Wochen nach Keimung Daten zum Phänotyp aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt hat der apikale Spross einen Kallus ausgebildet, der aber noch zur Blattbildung in der Lage ist (Abbildung 41E). Diese Blätter waren durchscheinend, an den Rändern der Blattspreite eingerollt und hatten unregelmäßige Formen. Ein Teil der Blätter hatte lange Petiolen, anderen fehlten die Petiolen ganz. Die Explantate von *asm4* Sprossmeristemen zeigten bei Kultivierung auf KS-Medium einen ähnlichen Phänotyp

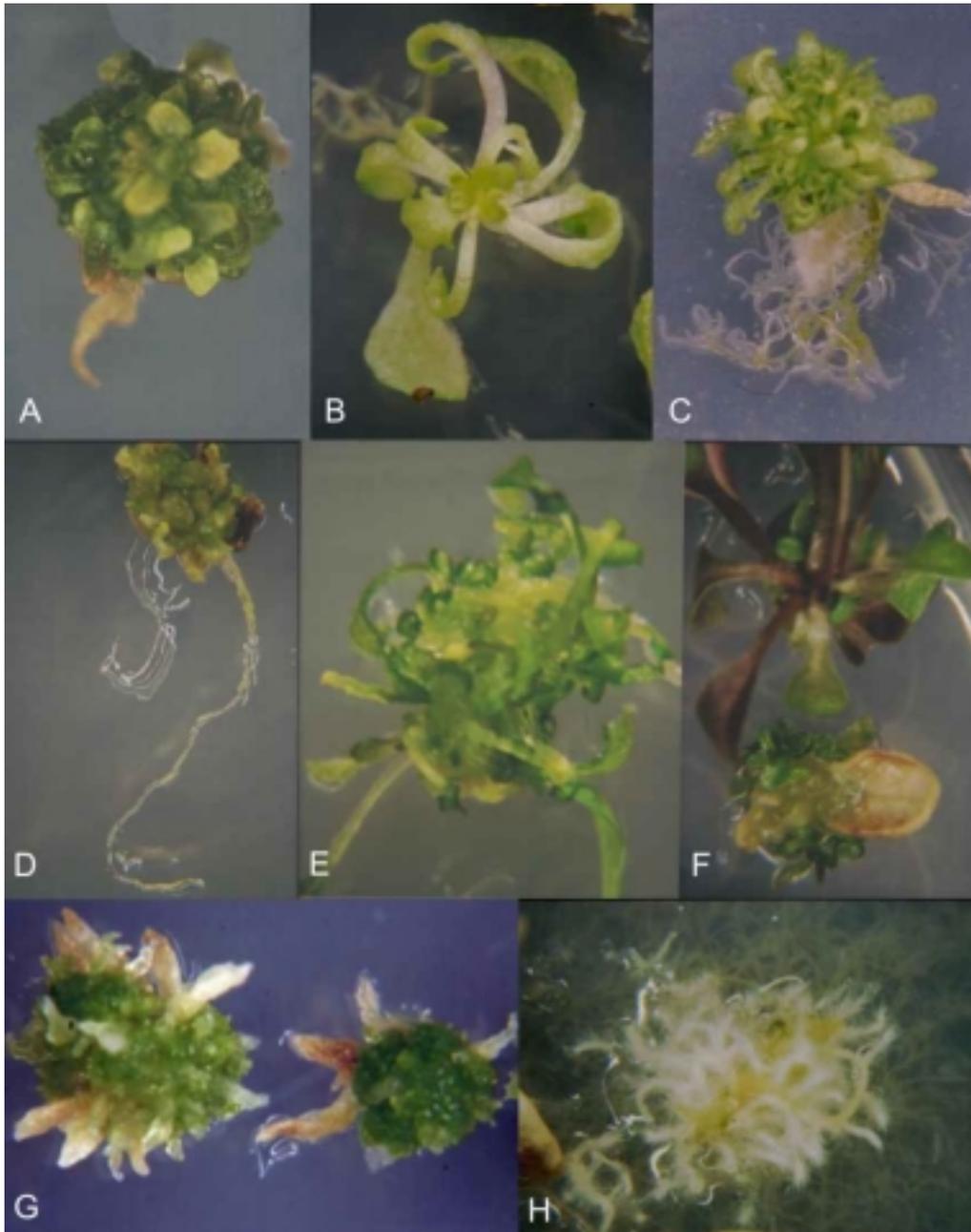


Abbildung 41: Phänotypen der *asm1-asm4* Mutanten. **A:** *asm1* Mutante, 4 wag. **B:** *asm2* Mutante, 4 wag. **C:** *asm2* Mutante, 8 wag. **D:** *asm3* Mutante, 4 wag. **E:** *asm4* Mutante, 4 wag. **F:** Meristemexplantat von WT Pflanze (oben) und *asm3* Mutante (unten), 4 Wochen nach Subkultivierung auf KS-Medium. **G:** Zwei Meristemexplantate von *asm2*, 4 Wochen nach Subkultivierung auf KS-Medium. **H:** Blattexplantat von *asm2*, 4 Wochen nach Subkultivierung auf KS-Medium.

3.8.2 Komplementationsanalyse der *asm1* Mutante

asm1 Mutanten zeigten in allen Wachstumsphasen einen ähnlichen Phänotyp wie *tsd1* Mutanten (Frank 1999). Um zu testen, ob die beiden Mutationen allelisch sind, wurden heterozygote *asm1* und *tsd1* Pflanzen gekreuzt und die F1-Generation dieser Kreuzung auf Pflanzen mit *asm1* Phänotyp hin untersucht. Bei 7 Kreuzungen traten in der F1-Generation bei insgesamt 19 % (25 von 131) der Pflanzen ein *asm1/tsd1* Phänotyp auf. Aufgrund der so nachgewiesenen Allelie von *asm1* zu *tsd1* wurde die *asm1* Mutante nicht weiter charakterisiert.

4. Ergebnisteil B: Charakterisierung und Identifizierung der *Atckx* Mutanten

4.1. Insertionsmutanten von *AtCKX* Genen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden gezielt Mutationen in Genen gesucht, deren Ausfall möglicherweise eine Gewebedifferenzierung verursachen könnte. Gene, die für Cytokininoxidasen (CKX) kodieren, wurden dafür ausgewählt, da sie die entscheidende Rolle beim Cytokininkatabolismus spielen. (Morris et al. 1999, Houba-Hérin et al. 1999) Ein Genausfall führt möglicherweise zum Anstieg der endogenen Cytokininkonzentration, verursacht so eine verstärkte Zellproliferation und damit einhergehend eine veränderte Differenzierung, die zu einem ähnlichen phänotypischen Ergebnis wie bei Cytokininüberproduzenten führen könnte. Die Funktionalität von vier der sechs Mitglieder der *AtCKX*-Genfamilie wurde jüngst gezeigt (Bilyeu et al. 2001; Werner et al. 2001). Eine erhöhte Expression der *AtCKX1* – *AtCKX4* Gene verursacht eine verstärkte Wurzelbildung und ein verstärktes Wurzelwachstum, die Sprossentwicklung wird hingegen inhibiert (Werner et al. 2001; T. Werner, persönliche Mitteilung).

Der klassische Weg zur Isolierung von Mutanten, ist der vom Phänotyp zum Genotyp. Man untersucht eine mutagenisierte Pflanzenpopulation mit Hilfe eines definierten Screens (siehe z.B. Charakterisierung der *tup* Mutanten) auf spezifische Mutantenphänotypen und identifiziert dann durch positionelles Klonieren das betroffene Gen. Die Entschlüsselung des *Arabidopsis* Genoms und die Methode der Insertionsmutagenese mit T-DNA oder Transposons ermöglicht den reversen genetischen Ansatz, d.h. Gene unbekannter Funktion in der Pflanze zu mutagenisieren und dann Veränderungen an der Mutante zu beobachten. Nur von einem kleinen Teil der Gene des *Arabidopsis* Genoms ist bisher die Funktion bekannt (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Computeranalysen erlauben Aussagen zu Gen- und Proteinstruktur, aber eine wichtige Untersuchung ist die Analyse der Konsequenzen des Verlusts der Genfunktion. T-DNA und Transposons als biologische Mutagene haben Vorteile gegenüber chemischen oder physikalischen Mutagenisierungsmethoden, da deren Sequenzen bekannt sind und die Insertionsorte so mittels molekularer Methoden im Genom wiedergefunden werden können (*gene tagging*).

Es gibt mittlerweile viele Kollektionen von T-DNA- oder Transposon-mutagenisierten Pflanzen (Feldmann 1991, Aarts et al. 1995, Krysan et al. 1996, Wisman et al. 1998, Tissier et al. 1999). Diese können auf Insertionen in bestimmten Genen untersucht werden. Mit Hilfe der PCR Technik lassen sich Insertionsorte durch geeignete Wahl von genspezifischen und T-DNA- bzw. Transposon-spezifischen Primern amplifizieren und so sichtbar machen. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von Insertionsorten besteht darin, diese zu amplifizieren und die PCR Produkte auf Filtern als Microarrays aufzutragen. Eine genspezifische Sonde

kann an der entsprechenden Stelle hybridisieren und so Insertionen in bestimmten Genen identifizieren (Tissier et al. 1999).

4.1.1. Transposon-Linien

4.1.1.1. Primerdesign und Screening nach *En1*-Insertionsmutanten

Die Primer wurden nach den Kriterien des ZIGIA Projekts (s. Material und Methoden) erstellt. Die Primer wurden auf ihre Kompatibilität untereinander und mit den Transposonprimern getestet. Dazu wurden PCRs mit unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung 1 zeigt exemplarisch für ein Gen das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der PCR Produkte sowie des *Southern blots* nach Hybridisierung mit genspezifischer, radioaktiv markierter Sonde. In den ersten vier PCR Reaktionen wurden je zwei genspezifische Primer eingesetzt, um deren Funktionalität zu testen (Abbildung 1A, Spur 2-5, Abbildung 1C,D). Die Kompatibilität der Genprimer mit den Transposonprimern wurde in weiteren vier PCR Reaktionen unter Verwendung von genspezifischen und transposonspezifischen Primern überprüft (Abbildung 1, Spur 6-9). Dabei wurde als Template DNA mit einer großen Zahl von Transposons (*Multi-copy En1* DNA) verwendet, um die Versuchsbedingungen nachzustellen. Die Primer, die zu starken und spezifischen Amplifikaten geführt hatten und zudem keine unspezifischen Amplifikate in den Kompatibilitätstests erbracht hatten, wurden für das Screening ausgewählt. Bei einigen Primertests entstand, wie z.B. bei der Primerkombination von En8130 und *cox4B*, ein deutliches PCR Produkt (Abbildung 1B, Spur 8). Per *Southern blot* konnte in allen Fällen die Spezifität des PCR Produkts nachgewiesen werden (Beispiel in Abbildung 1B, Spur 8). Dies deutete auf das Vorhandensein einer Insertion im *AtCKX4* Gen in der Pflanzenpopulation hin. Für *AtCKX1*, *AtCKX2* und *AtCKX3* wurden die gleichen Testreaktionen durchgeführt.

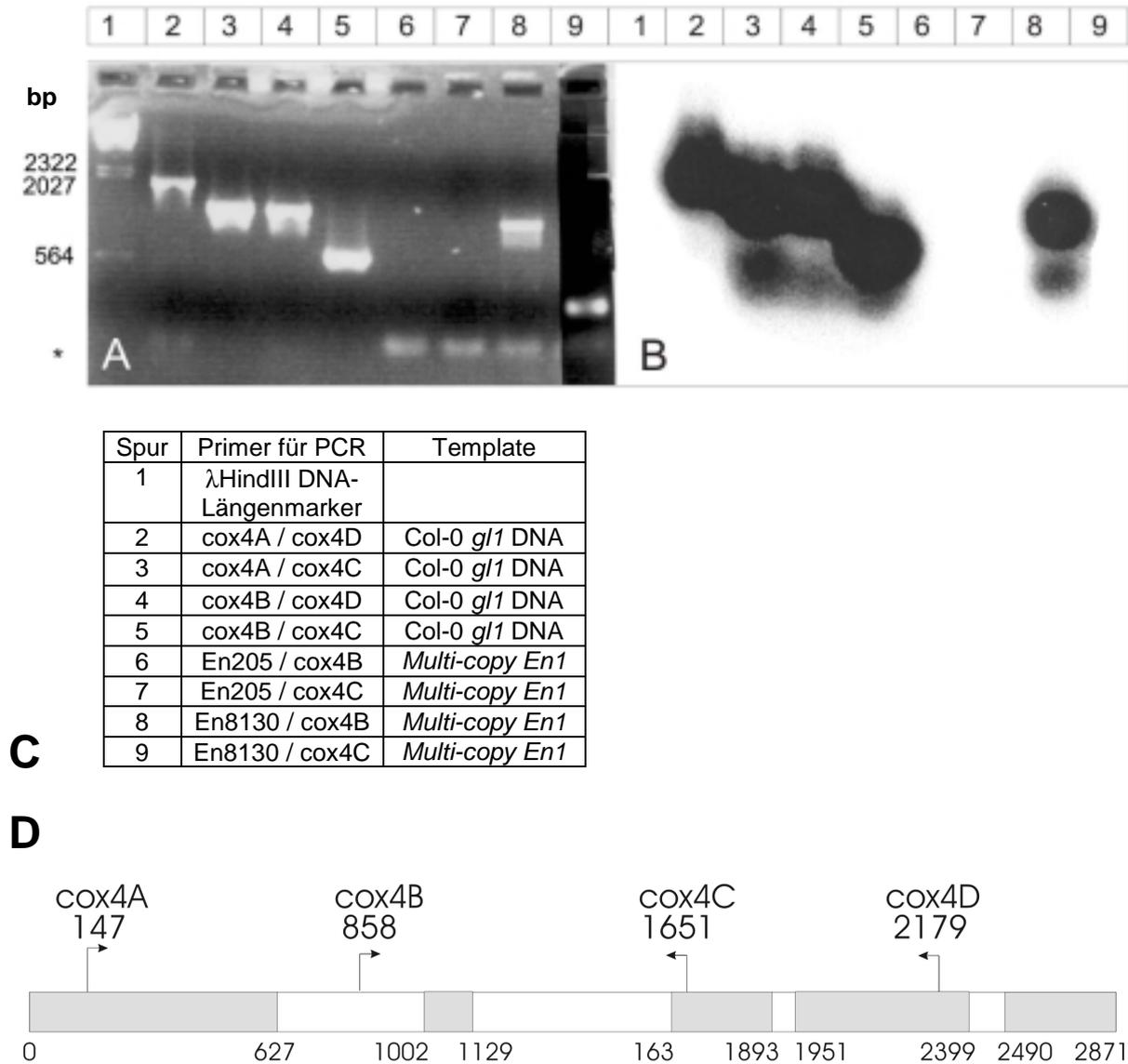


Abbildung 1: Test der *AtCKX4* Primer auf Kompatibilität untereinander (Spur 2 – 5) und mit den zwei Transposon-Primern (Spur 6 – 9). **A:** Gelbild der PCR Produkte; die Zahlen links bezeichnen die Länge der DNA-Fragmente in Basenpaaren, der Stern (*) markiert die Primerbanden. **B:** Autoradiographie nach *Southern blot* des Gels und Hybridisierung mit einer ^{32}P -markierten *AtCKX4*-spezifischen DNA-Sonde. **C:** Beschreibung der einzelnen Gelspuren, *Multi-copy En1* = DNA in der viele *En1*-Transposons enthalten sind. **D:** Lage der Primer *cox4A*-*cox4D* in *AtCKX4*, graue Bereiche markieren Exons, weiße Bereiche Introns, Zahlen bezeichnen Entfernung vom Startcodon von *AtCKX4* in Basenpaaren.

Die PCRs und führten zu Produkten mit Primern von *AtCKX2*, *AtCKX3* und *AtCKX4* in Kombination mit transposonspezifischen Primern. Die Ergebnisse dieser PCR-Analyse der *En1*-Insertionslinien wurden in Tabelle 8 zusammengefasst. Da die DNA der Pflanzen dreidimensional gepoolt war, konnte nach Durchführung des Tests sofort die Einzelpflanze mit der entsprechenden Insertion ermittelt werden. Die Samen der Nachkommen wurden ausgesät, von den herangewachsenen Pflanzen DNA-Proben genommen und Test-PCRs durchgeführt. Die Test-PCR mit je einem gen- und transposonspezifischen Primer wurde

exemplarisch für die Insertion in *AtCKX2* dargestellt (Abbildung 2, Spur 1A-5A mit DNA von 5 F1-Pflanzen der getaggtten Elternpflanze). Die Abbildung2 (Spur 1A-5A) zeigt, dass alle 5 untersuchten Pflanzen das *En1*-Insert tragen. Zur exakten Bestimmung der Insertionsorte wurden die PCR Produkte sequenziert und die Sequenzen durch Sequenzvergleiche in Gendatenbanken (BLAST Search bei NCBI: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/>) analysiert (Tabelle 9). Dabei konnte sowohl der DNA-Abschnitt des *En1*-Transposons, als auch des jeweiligen *AtCKX* Gens ermittelt werden und so die Insertionsstelle genau bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 1: *En1*-Linien aus dem ZIGIA Projekt mit Insertionen in *AtCKX* Genen.

Gen	Anzahl gefundener Insertionen	Bestätigte unabhängige Insertionen
<i>AtCKX1</i>	0	0
<i>AtCKX2</i>	2	2
<i>AtCKX3</i>	3	2
<i>AtCKX4</i>	7	3

Tabelle 2: Lokalisation der *En1*-Insertionen in den jeweiligen *AtCKX* Genen.

Insertion	Insertionsort (bp ab Startcodon)	Insertionsort (Bezeichnung des BAC)	Liegt in Exon (E) Nr./ Intron (I) Nr.
<i>AtCKX2-1</i>	514	43197 (ATAC005917)	E1
<i>AtCKX2-2</i>	1727	41984 (ATAC005917)	I2
<i>AtCKX3-1</i>	306	32419 (AB024035)	E1
<i>AtCKX3-2</i>	767	31949 (AB024035)	I1
<i>AtCKX4-1</i>	973	77160 (AL079344)	I1
<i>AtCKX4-2</i>	1301	77488 (AL079344)	I2
<i>AtCKX4-7</i>	2395	78582 (AL079344)	E4

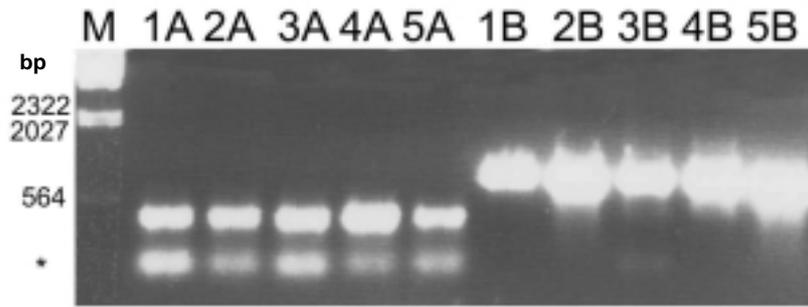


Abbildung 2: Test-PCRs der DNA von 5 Pflanzen zum Nachweis des *En1*-Insert in *AtCKX2* (1A-5A) und des Vorhandenseins eines *AtCKX2* Gens ohne Insert (1B-5B). M = Marker λ HindIII, 1A-5A = PCR Produkte mit *AtCKX2* Primer CB3 und *En1*-Primer En8130 mit einer Länge von ca. 350 bp (s. Abbildung 44), 1B-5B = PCR Produkte mit *AtCKX2* Primern CB2 und CB3, mit einer Länge von ca. 900bp.

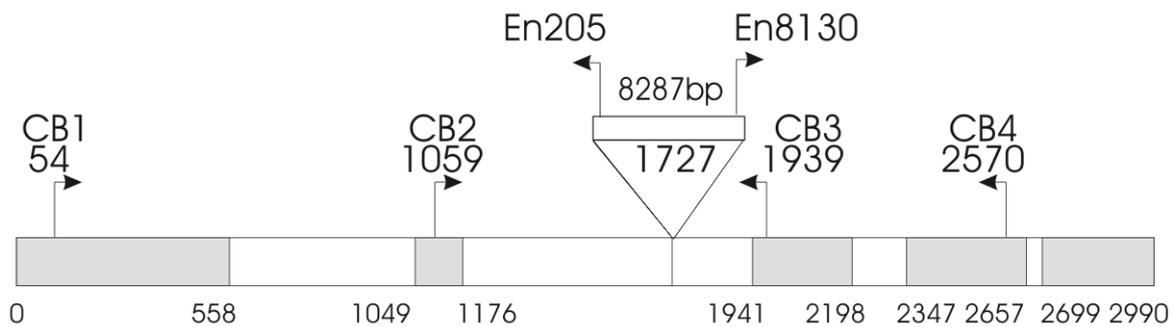


Abbildung 3: Lage der Primer (Pfeile) von *AtCKX2* (Rechteck) und des Insertionsorts des *En1*-Transposons (Dreieck). Graue Bereiche markieren Exons, weiße Bereiche Introns, Zahlen bezeichnen die Entfernung vom Startcodon von *AtCKX2* in Basenpaaren, CB1-CB4 = Primer für *AtCKX2*, En205 und En8130 = Primer für das *En1*-Transposon.

Um die bezüglich der *En1*-Insertion im jeweiligen *AtCKX* Gen heterozygoten Pflanzen von den homozygoten Pflanzen zu unterscheiden, wurden zwei PCR durchgeführt. In der ersten Reaktion (PCR1) wurde ein genspezifischer und ein transposonspezifischer Primer eingesetzt, um die Insertion zu bestätigen. Abbildung 43, Spur 1A-5A und Abbildung 45, Spur 1A-8A zeigen die PCR-Produkte der DNA von Pflanzen, die eine Insertion in *AtCKX2* bzw. *AtCKX4* tragen. Die zweite PCR (PCR2) wurde mit zwei genspezifischen Primer durchgeführt, die den Insertionsort einrahmten. Ein PCR Produkt in der ersten Reaktion und ein Ausfall des PCR Produkts in der zweiten Reaktion waren ein Hinweis auf eine Pflanze, in der beide Allele des Gens durch die Insertion unterbrochen waren. In nur einem Fall (*Atckx4-2*) konnte so eine homozygote Insertionslinie gefunden werden (Abbildung 45), denn in den PCR2-Reaktionen war entweder kein PCR Produkt zu erkennen oder nur eine schwache Bande bei ca. 4,3 kb. Die zu erwartende Bande hätte bei Insertion eines vollständigen Transposons eine Länge von ca. 9,6 kb (ca. 8,3 kb Transposonlänge, ca. 1,3 kb Länge des Amplifikats der Primer *cox4-2* und *cox4-4*). Die PCR wurde mit einem weiteren, den Insertionsort flankierenden Primerpaar (*cox4-1* und *cox4-3*) wiederholt und ein PCR Produkt vergleichbarer Länge amplifiziert. Somit besteht das tatsächliche Insert nur aus einem Teil

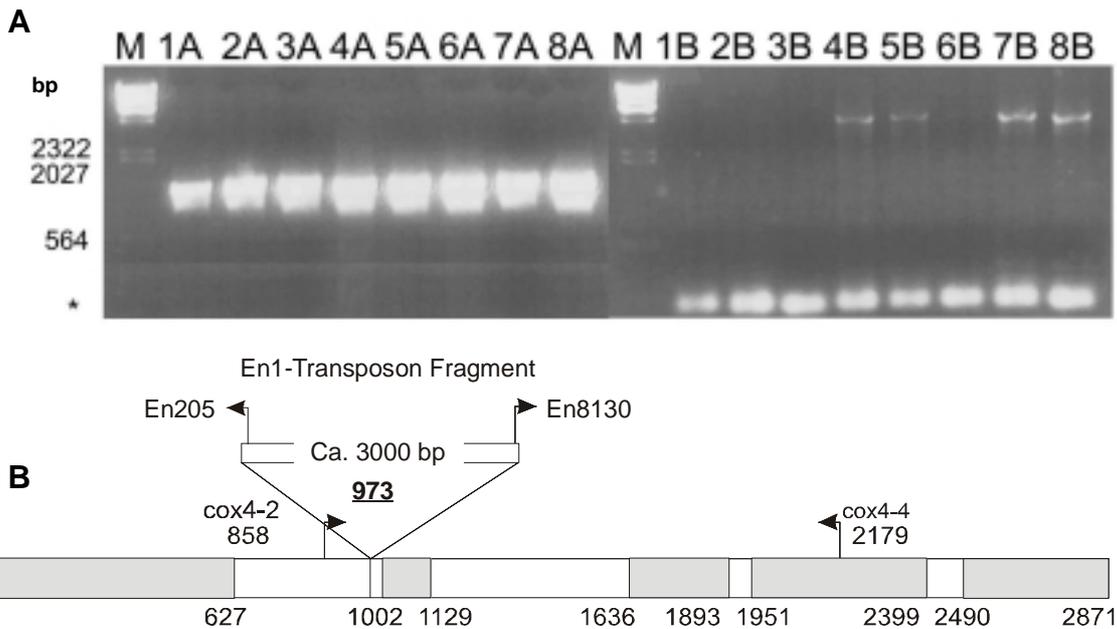


Abbildung 4: **A:** Test-PCR der DNA von 5 Pflanzen in deren Elternpflanze ein *En1*-Insert im *AtCKX4* inseriert hatte. M = Marker λ HindIII, 1A-8A = PCR Produkte mit *AtCKX4* Primer *cox4-4* und *En1* Primer En8130, 1B-8B = PCR Produkte mit *AtCKX4* Primern *cox4-2* und *cox4-4*. **B:** Lage der Primer (Pfeile) von *AtCKX4* (Rechteck) und des Insertionsorts des *En1*-Transposons (Dreieck). Graue Bereiche markieren Exons, weiße Bereiche Introns, Zahlen bezeichnen die Entfernung vom Startcodon von *AtCKX4* in Basenpaaren, *cox4-2* und *cox4-4* = Primer für *AtCKX4*, En205 und En8130 = Primer für das *En1*-Transposon.

des Transposon und hat eine Länge von ca. 3 kb. Bei den anderen 6 Insertionslinien von *AtCKX2*, *AtCKX3* und *AtCKX4* stellte sich in der PCR immer die heterozygote oder wildtypische Situation dar (Tabelle 10). Abbildung 43 (Spur 1A-5A und Spur 1B-5B) zeigt am Beispiel von *AtCKX2* eine solche heterozygote Situation, bei der in beiden Test-PCR Amplifikate entstanden. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Tests auf Homozygotie der *En1*-Insertion zusammengefasst.

Tabelle 3: Auswertung des PCR-Tests der *En1*-Insertionslinien in *AtCKX* Genen.

Insert	Anzahl getesteter Nachkommen	keine <i>En1</i> -Insertion im <i>AtCKX</i> Gen	heterozygot bezüglich <i>En1</i> -Insertion	homozygot bezüglich <i>En1</i> -Insertion
		PCR1 ⁻¹ PCR2 ⁺¹	PCR1 + PCR2 +	PCR1 + PCR2 -
<i>AtCKX2</i> -1	18	1	17	0
<i>AtCKX2</i> -2	8	0	8	0
<i>AtCKX3</i> -1	19	6	13	0
<i>AtCKX3</i> -2	24	2	22	0
<i>AtCKX4</i> -1	30	3	27	0
<i>AtCKX4</i> -2	35	0	0	35
<i>AtCKX4</i> -7	19	0	10	0

¹ Plus und Minuszeichen stehen für PCR mit Amplifikat bzw. ohne Amplifikat.

4.1.2. T-DNA-Insertionsmutanten

4.1.2.1. *Knock-out*-Linien der Wisconsin-Kollektion

Die Kollektion von T-DNA Insertionslinien, die an der University of Wisconsin (USA) durch Transformation mit dem T-DNA Vektor pD991 erstellt wurde, besteht aus 60480 Einzellinien (Krysan et al. 1996, Krysan et al. 1999, Sussman et al. 2000). Von diesen war DNA in 30 Superpools à 2025 Einzelproben zusammengeführt worden. Diese Superpools setzten sich aus 270 Subpools mit je 225 Pflanzen zusammen. Die Samen dieser transformierten Linien waren zu Samenpools aus je 9 Einzelpflanzen zusammengefasst worden. Insgesamt gab es 6720 solcher Neunerpools.

Zur Bestimmung einzelner Insertionslinien für ein bestimmtes Gen mussten 3 aufeinanderfolgende Screens ausgeführt werden. Im *First Round Screen* wurden zwei PCR Reaktionen durchgeführt, die sich nur in der Wahl der Primer und des Templates unterschieden. Es wurde jeweils einer der beiden zuvor erstellten Randprimer des Gens und der *Left Border*-Primer der T-DNA zusammen mit je einem Template aus den 30 Superpools eingesetzt. Die PCR Produkte wurden an der University of Wisconsin synthetisiert. Durch Auftrennung der Amplifikate im Agarosegel, Southern Blots, Hybridisierung mit genspezifischen Sonden und Sequenzierung der PCR Produkte konnten Insertionen gefunden werden. Die Insertionsstellen der einzelnen T-DNAs konnten durch Sequenzvergleiche (BLAST Search bei NCBI <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/>) genau lokalisiert werden. War die Insertionsstelle innerhalb des Gens, wurde eine weitere PCR (*Second Round Screen*) mit den entsprechenden DNA-Subpools und den jeweiligen Primern durchgeführt. Konnte die Insertion im *Second Round Screen* bestätigt werden, arbeitete man mit einem Samenpool, bestehend aus 25 Neunerpools, weiter. Aus den gekeimten Samen dieser Pools wurde DNA extrahiert und versucht, das PCR Produkt aus dem *Second Round Screen* zu reproduzieren. Geling dies, konnte man aus dem positiven Neunerpool Samen aussäen und in einem weiteren PCR-Schritt Einzelpflanzen bestimmen, die die Insertion trugen.

4.1.2.1.1. First und Second Round Screen

Es wurden für *AtCKX1* insgesamt 3, für *AtCKX2-CKX6* jeweils ein *First Round Screen* durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung 46 zeigt exemplarisch die Vorgehensweise beim *First Round Screen*.

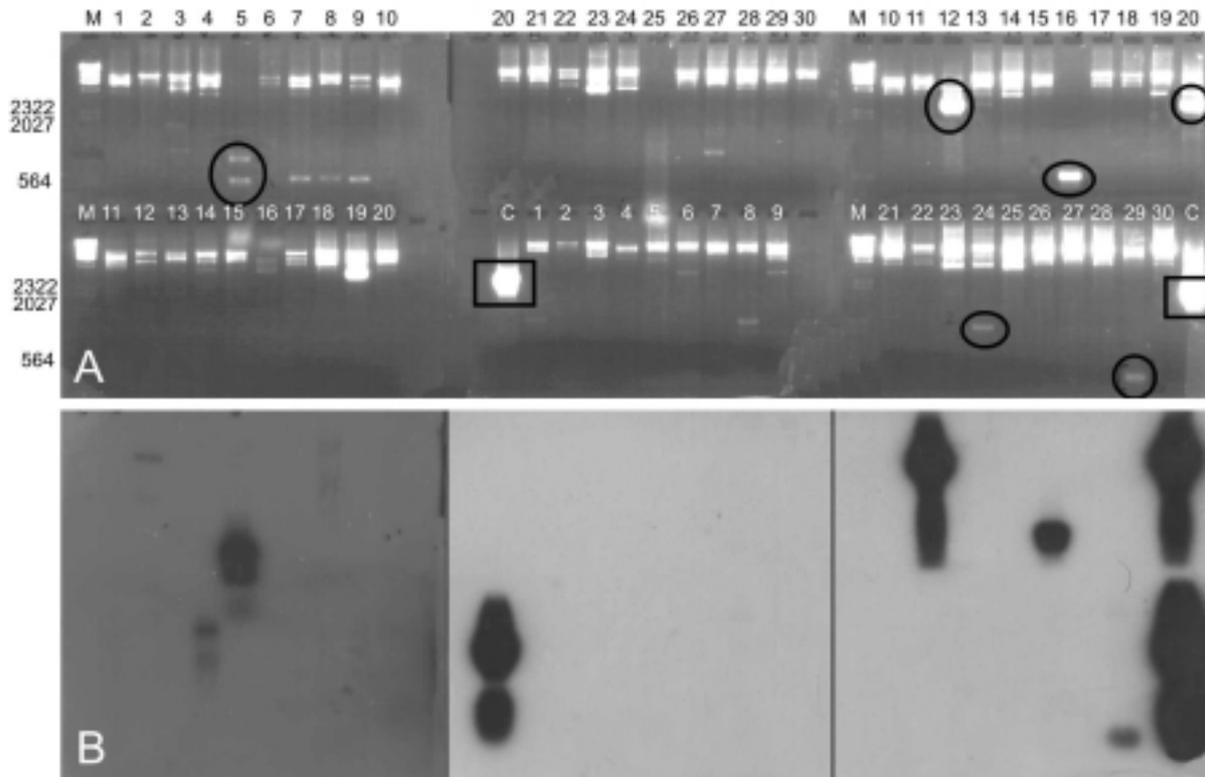


Abbildung 5: *First Round Screen* am Beispiel von *AtCKX3*. PCRs und *Southern Blots* der 30 Superpools der T-DNA Insertionslinien aus Wisconsin. **A:** Agarosegel mit PCR Produkten der *AtCKX3* und JL202 Primer. M = Marker λ HindIII, Länge der Banden in Basenpaaren angegeben. Spur 1-30 = PCR Produkte mit den 30 Superpools als Template und den Primern *cox3-1c* (bzw *cox3-4c* in der zweiten Hälfte) und JL202. **B:** Autoradiographie nach *Southern blot* der Gele und Hybridisierung mit einer 32 P-markierten *AtCKX3*-spezifischen DNA-Sonde, C = Kontroll-PCR mit WT DNA und Primern *cox3-1c* und *cox3-4c*; Kreis = PCR Produkt wurde genauer untersucht, da positive Hybridisierung, Rechteck = Kontroll-PCR Produkt. Subpool 20 wurde für den *Second Round Screen* verwendet.

Tabelle 4: Zusammenstellung der gefundenen T-DNA Insertionen in den *AtCKX* Genen

Insertion in Gen:	verwendeter T-DNA Primer	Positive PCR u. Hybridisierung	Sequenzierung erfolgreich	Insertionsort (Lokalisation auf BAC)	Insertionsort (bp ab Startcodon)
<i>AtCKX1</i>	JL202 ¹	2	1	18352 (AC002510)	+ 650 <i>downstream</i> des Stopcodons.
<i>AtCKX1</i>	XR2 ¹	0	0	-	-
<i>AtCKX2</i>	JL202	3	3	42883 (AC005917) 41249 41145	828 (I1) 2462 (E4) ² 2566 (E4)
<i>AtCKX3</i>	JL202	6	2	33069 (AB024035) 32825 30475	-353 (<i>upstream</i>) -109 (<i>upstream</i>) ² 2240 (I2)
<i>AtCKX4</i>	JL202	2	1	77935 (AB024035)	1748 (E3) ²
<i>AtCKX5</i>	JL202	5	3	45137 (AC023754) 45851 46130	1381 (I3) ² 2095 (I4) 2374 (I4)
<i>AtCKX6</i>	JL202	3	1	48746 (AL163818)	+ 181 <i>downstream</i> des Stopcodons.

¹JL202 = *Left border*-Primer, XR2 = *Right border*-Primer.

²Insertionen, die für den *Second Round Screen* verwendet wurden, sind farblich unterlegt.

E1 – E4 = Exon 1 – Exon 4

I1 – I4 = Intron 1 – Intron 4

Die PCR Reaktionen in den jeweiligen Subpools für Insertionen in *AtCKX2-AtCKX5* führten in jeweils einem Subpool zu einem PCR Produkt, welches der jeweiligen erwarteten Länge entsprach und im *Southern Blot* bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.1.2.1.2. Auffinden der Einzellinie

Die im *Second Round Screen* bestimmten 25 Neunerpools wurden vom ABRC (<http://aims.cse.msu.edu/aims>) bestellt, von den gekeimten Samen DNA extrahiert und der Neunerpool mit der richtigen Insertionslinie bestimmt. Das gelang für die Gene *AtCKX2*, *AtCKX3* und *AtCKX5*. Die im *Second Round Screen* bestätigte Insertionslinie im *AtCKX4* Gen konnte auch nach zweimaliger Durchführung der PCRs nicht wieder gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der Einzelpflanzen wurden Samen der Neunerpools auf Erde ausgelegt, und extrahierte DNA von den Pflanzen für PCR eingesetzt. Für *AtCKX2* und *AtCKX5* konnten sowohl heterozygote als auch homozygote Einzellinien identifiziert werden. Für *AtCKX3* wurden 12 heterozygote Insertionslinien bestimmt, jedoch keine einzige Homozygote.

4.1.2.1.3. Zusammenstellung der gefundenen Insertionslinien

Alle T-DNA- und Transposon-Insertionen, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, sind in der Abbildung 47 zusammengefasst. Dabei wurden sowohl die Insertionsorte genau angegeben, als auch der Stand der Forschung für die jeweiligen Insertionen. Die drei mit einem Kreis gekennzeichneten homozygoten Insertionslinien werden im folgenden mit *Atckx2*, *Atckx4* und *Atckx5* bezeichnet. Die *Atckx3* Linie, in der bisher nur die Insertion betreffende heterozygote Einzellinien gefunden werden konnten, wurde mit einem Rechteck markiert.

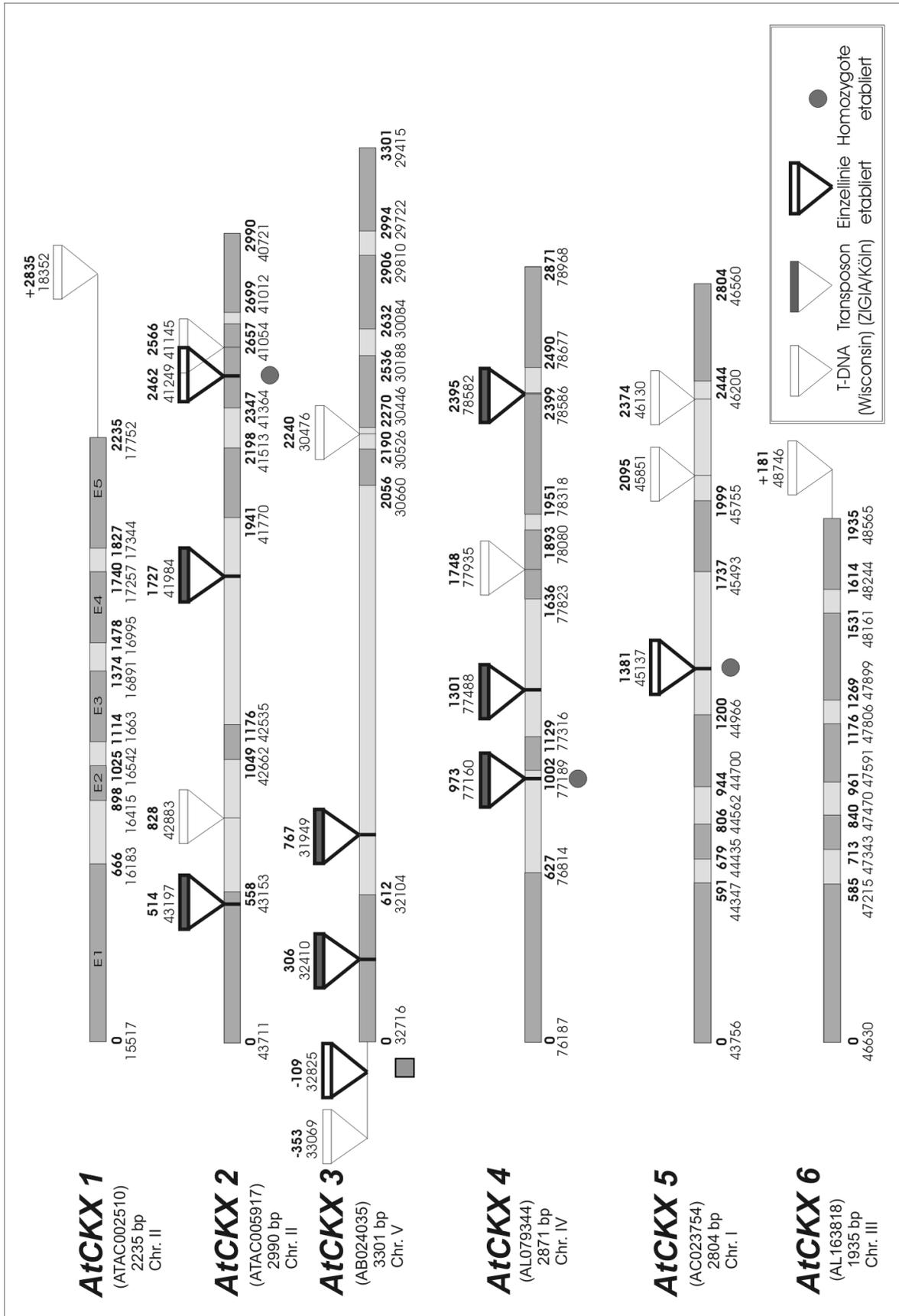


Abbildung 6: Insertionsorte der Transposons und in T-DNA getaggten Insertionslinien. Die Insertionen sind in unabhängigen Einzellinien. Das Rechteck bezeichnet die Mutante *Atckx3* für die bisher nur heterozygote Einzellinien gefunden werden konnten.

4.1.3. Phänotypische Charakterisierung der *Knock-out*-Linien *Atckx2*, *Atckx3*, *Atckx4* und *Atckx5*

Für eine erste phänotypische Untersuchung der *AtCKX*-Insertionslinien wurde folgende Kriterien verwendet.

1. Gibt es auffällige morphologische Unterschiede im Vergleich zu WT Pflanzen bei Wachstum *in vitro* oder auf Erde?

Dazu wurden die homozygoten *Atckx* Pflanzen *in vitro* kultiviert und alle zwei bis drei Tage auf phänotypische Unterschiede zu WT Pflanzen untersucht. Es konnten keine sichtbaren Unterschiede entdeckt werden. Auch bei Wachstum auf Erde konnten keine Unterschiede im Wachstumsverhalten von WT und *Atckx* Pflanzen gefunden werden.

2. Es wurde eine quantitative Analyse des Wachstums der Primärwurzel und der Blattbildung durchgeführt, da eine Erhöhung der *AtCKX*-Genexpression diese beiden Parameter besonders stark verändert (Werner et al. 2001). Dafür wurde die Wurzellänge von jeweils 10 Pflanzen nach 14 Tagen vermessen und die Blattzahl nach drei Wochen im Vergleich zu WT festgehalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 festgehalten. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen *Atckx* und WT Pflanzen festgestellt.

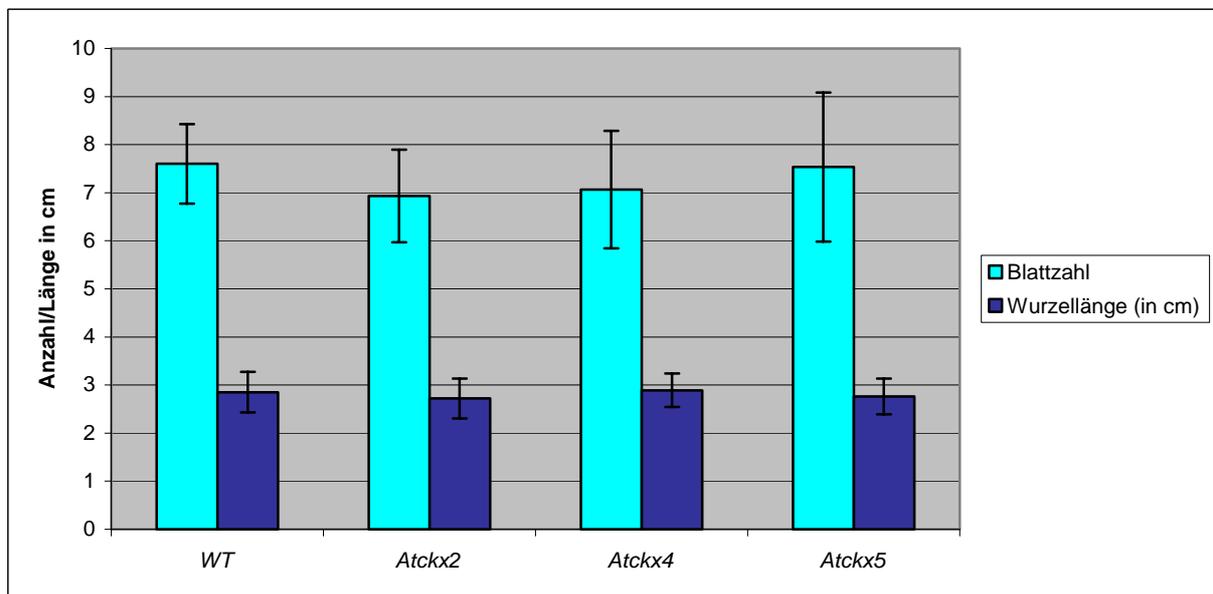


Abbildung 7: Wurzellänge und Blattzahl von WT, *Atckx2*, *Atckx4* und *Atckx5* Pflanzen zwei, bzw. drei Wochen nach Keimung *in vitro*.

3. Werner et al. (2001) konnten zeigen, dass in *AtCKX2* konstitutiv überexprimierenden Tabak-Pflanzen die 2iP-Konzentration auf bis zu 31% der Konzentration in WT Pflanzen sinkt. Deshalb wurde versucht, die 2iP-Sensitivität von *Atckx2* Pflanzen anhand der Inhibierung des Wurzellängenwachstums zu bestimmen. Es wurde keine signifikante Veränderung des Wurzelwachstums von *Atckx2* Pflanzen im Vergleich zu WT Wurzeln festgestellt (Abbildung 8).

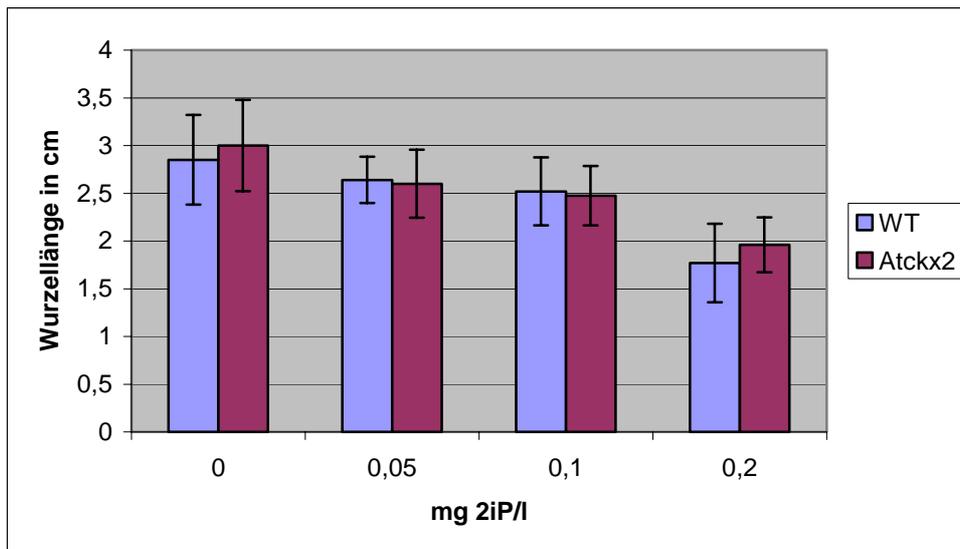


Abbildung 8: Wurzellänge von 14 Tage alten WT und *Atckx2* Pflanzen in Abhängigkeit von der 2iP-Konzentration (mg/l). Stichprobe waren jeweils 20 Pflanzen.

Samenanalyse von *Atckx3*

Da es nicht gelungen war, eine homozygote *Atckx3* Pflanze zu isolieren, wurde das Keimungsverhalten von *Atckx3* Samen untersucht. Von drei heterozygoten *Atckx3* Pflanzen wurden jeweils 80 Samen *in vitro* ausgelegt. 239 von 240 Samen keimten. Bei Untersuchung von Schoten der *Atckx3* Pflanzen konnten keine sichtbaren embryoletalen Samen gefunden werden.

5 Diskussion

Cytokinine und Auxine sind wichtige regulatorische Faktoren bei Teilungs- und Differenzierungsvorgängen der pflanzlichen Zelle (Miller und Skoog, 1957). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze verwandt, um genetische Faktoren zu identifizieren, die an der Signalkette zwischen Hormonen und Zellteilungs- oder Zelldifferenzierungskontrolle beteiligt sind. In einem Kallusscreen wurden EMS-induzierte Mutanten von *Arabidopsis thaliana* isoliert, die konditionell auf Medium mit niedrigen Cytokinin/Auxinkonzentrationen Kalli an Gewebeexplantaten entwickelten. Mit diesem Versuchsansatz konnten zwei Klassen kallusbildender Mutanten gefunden werden. Die Klasse der *altered shoot meristem* Mutanten (*asm1-4*) zeigte schon auf hormonfreiem Medium eine gestörte Entwicklung und Kallusbildung des Sprossmeristems. Diese *asm* Mutanten wiesen Ähnlichkeiten mit den von Rupp (1997) und Frank (1999) isolierten *shoody-callus* bzw. *tumorous shoot development (tsd)* Mutanten auf. Zudem konnte gezeigt werden, dass *asm1* allelisch zu *tsd1* ist. Deshalb konzentrierte sich ein Großteil der genetischen und phänotypischen Charakterisierung auf die zweite Klasse der *tumor prone (tup)* Mutanten. Auf niedrigkonzentriertem Cytokinin/Auxinmedium entwickelten sich an Wurzel- und Hypokotylexplantaten Kalli, die zum Teil zur Organogenese fähig waren. Die *tup* Mutanten stellen eine neue Klasse von Mutanten dar, die in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde.

Vor kurzem konnte die Funktionalität der Cytokininoxidasen aus *Arabidopsis* und Mais gezeigt werden (Morris et al. 1999, Houba-Hérin et al. 1999, Bilyeu et al. 2001, Werner et al. 2001). Eine konstitutive Expression von *AtCKX1* - *AtCKX 4* in *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen führt zu einer Verringerung der endogenen Cytokininkonzentration, einem vergrößerten Wurzelsystem, sowie einer Hemmung des Sprosswachstum (Werner et al. 2001, Werner persönliche Mitteilung). Da die Cytokininoxidasen somit eine entscheidende Rolle beim Abbau der Cytokinine spielen, wurde vermutet, dass eine Mutation in diesen Genen möglicherweise die Cytokininkonzentration erhöht und somit zu ähnlichen Phänotypen wie bei Cytokininüberproduzenten führen könnte. Deshalb wurden im zweiten Teil der Arbeit *Knock-out* Mutanten von *A. thaliana* von Mitgliedern der *AtCKX* Genfamilie isoliert und phänotypisch charakterisiert.

5.1 Etablierung des Kallusscreens

Durch drei zentrale Vorversuche konnten Parameter bestimmt werden, mit Hilfe derer ein Screen auf Mutanten mit hormonabhängiger Kallusbildung etabliert wurde. Im ersten

Versuch wurden Explantate verschiedener Pflanzengewebe auf hormonfreiem Medium kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen die Explantate (mit Ausnahme von Spross- und Wurzelmeristem) nicht zur Ausbildung von Kallusgewebe oder meristematischem Gewebe in der Lage sind. Dies war ein erster Hinweis, dass auftretende Veränderungen an den Explantaten spezifisch von Mutationen ausgelöst würden.

In einem weiteren Versuch wurde eine geeignete Cytokinin- und Auxinkonzentration gesucht. Dazu wurden Hormonmatrizen erstellt und verschiedene Cytokinine und Auxine getestet. Das Ziel war, Cytokinin- und Auxinkonzentrationen zu finden, die einerseits so niedrig waren, dass keine unspezifischen Kallusbildungen auftraten und andererseits doch so hoch, dass schon geringe Unterschiede im Hormongehalt oder in der Hormonantwort zu einer phänotypischen Veränderung führten. Außerdem wurde ein ausgewogenes Konzentrationsverhältnis von Cytokinin und Auxin angestrebt, um bei einer Veränderung des Hormongehaltes oder der Hormonsensitivität eines der beiden Hormone phänotypische Unterschiede zu WT zu erkennen.

Die Hormonmatrix bestehend aus 2,4D und Kinetin erwies sich als ungeeignet für einen Kallusscreen, da es selbst bei einer um den Faktor 20 niedrigeren 2,4D-Konzentration im Verhältnis zur Kinetinkonzentration zu keiner Sprossbildung an Wurzelexplantaten kam. Zudem wurde die Chlorophyllbildung an den Kalli noch bei einem Cytokinin/Auxin-Konzentrationsverhältnis von 1:8 unterdrückt, und an den Kalli bildeten sich auch bei diesem Konzentrationsverhältnis noch Wurzeln aus. Kubo et al. (2000) hatten in ihrem Hypersensitivitätsscreen für Cytokinine bei einem Kinetin/2,4D-Verhältnis von 20:1 auch keine Sprosse an Hypokotylexplantaten induzieren können.

Die Hormonmatrix mit den Hormonen 2iP und NAA zeigte die gewünschten Eigenschaften. Es kam bei einem hohen Cytokinin/Auxin-Verhältnis zur Ausbildung von Sprosskalli und bei einem reziproken Verhältnis zur Ausbildung von Wurzelkalli. Ein gleichgewichtiges Verhältnis der beiden Hormone führte zur Ausbildung von Kalli mit Wurzeln und Sprossen. Die Hormonkonzentration von je 50 µg/l NAA und 2iP wurde für das Kallusscreening verwendet, da sich bei dieser Konzentration an den Explantaten keine Kalli ausgebildet hatten und somit die Entstehung von falschpositiven Kalli wenig wahrscheinlich war. Eine Erhöhung nur eines der beiden Hormone führte zu einer Spross- bzw. Wurzelkallusbildung. Dies zeigte, dass die Hormonkonzentration so gewählt war, dass eine geringfügige Erhöhung der endogenen Konzentration oder eine Veränderung der Hormonantwort zu phänotypischen Veränderungen der Explantate führen können.

In einem abschließenden Vorversuch, bei dem Explantate von den kallus- oder sprossbildenden Mutanten *sur1*, *amp1*, *tsd1* und *tsd2* (Chaudhury et al. 1993, Boerjan et al 1995, King et al. 1995, Frank 1999) auf KS-Medium kultiviert wurden (Tabelle 4), konnte an

Explantaten aller vier Mutanten eine Kallus- oder Sprossbildung gefunden werden. Dies war ein erster Hinweis, dass kallusbildende Mutanten mit dem Screen identifiziert werden können.

5.2 *tup* Mutanten

Nicht alle *tup* Mutanten zeigen die gleiche Sensitivität gegenüber Cytokinin und Auxin. Bei *tup1* und *tup2* wurde eine Kallusbildung nur auf KS-Medium beobachtet. Auf hormonfreiem Medium bilden diese Mutanten keine Kalli an der Pflanze aus. Im Gegensatz dazu zeigen *tup3* und *tup5* Mutanten auch ohne exogene Hormone eine Kallusbildung an Wurzeln und am Wurzelhals. Bei *tup4* Mutanten wurde noch nicht untersucht, ob die Kallusbildung hormonabhängig oder -unabhängig ist. Durch exogene Applikation von Cytokinin und Auxin wird diese Kallusbildung verstärkt. Dies deutet darauf hin, dass die *tup* Mutanten eine heterogene Gruppe darstellen, die vor allem durch ein gemeinsames Merkmal, nämlich die Kallusbildung, charakterisiert ist. Segregationsanalysen zeigten bei den Mutanten *tup1-tup5* einen monogenen und rezessiven Erbgang. In allen Fällen lagen die Segregationverhältnisse und die daraus ermittelten χ^2 -Werte unter dem kritischen Wert.

5.2.1 Die *tup1* Mutante

5.2.1.1 Der Phänotyp der *tup1* Mutante

Schon 5 Tage alte *tup1* Keimlinge zeigen einen deutlichen Wurzelphänotyp, mit einer im Vergleich zu WT Pflanzen um ca. 75% verkürzten Primärwurzel. Das verkürzte Wurzelmeristem von *tup1* deutet darauf hin, dass die meristematische Aktivität verringert ist, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Verkürzung auf eine Reduzierung der Zellgröße zurückzuführen ist. Die Primärwurzeln 5 Tage alter Keimlinge waren häufig basal vom Wurzelmeristem um bis zu 270° eingedreht, was darauf hinweist, dass am Wurzelmeristem ab einem bestimmten Zeitpunkt geotropisches Wachstum gestört ist (Abbildung 38B,I). Expressionsdaten von Markergenen deuten auf ein eingeschränktes Wachstum der Wurzel hin. So ist die Expression von cytokininsensitiven *ARR5::GUS* Konstrukten im Wurzelmeristem von *tup1* Pflanzen schon fünf Tage nach Keimung verringert und nach 15 Tagen nicht mehr meßbar. Auch eine zellzyklusabhängige *CycB1::GUS* Expression ist in 15 Tage alten *tup1* Primärwurzelmeristemen im Gegensatz zu WT nicht mehr detektierbar (Abbildung 39E,G). Die Primärwurzeln sind zu diesem Zeitpunkt aber nicht abgestorben, da die auxinabhängige Expression von *DR5::GUS* im Wurzelmeristem nachweisbar ist.

Interessanterweise sind die Sekundärwurzeln nicht in dem Maße in ihrem Wachstum beeinträchtigt wie die Primärwurzel, d.h. der Ausfall von *TUP1* ist in den Sekundärwurzeln nicht so relevant. Dieser Befund wird durch die vergleichbare Expression der untersuchten Promotor-GUS Konstrukte (*ARR5::GUS*, *DR5::GUS*, *KNAT1::GUS* und *CycB1::GUS*) in den Kontrollpflanzen und in *tup1* Mutanten bestätigt. Statt einer Inhibierung der Wurzelentwicklung kommt es zu einer vermehrten Initiierung von Lateral- und Adventivwurzeln bei *tup1* im Vergleich zu WT. Eine vermehrte Ausbildung von Sekundärwurzeln ist für mehrere Mutanten mit Wurzeldefekten beschrieben worden (Baskin et al. 1992, Mähönen et al. 2000). Somit sind insbesondere im Wurzel und Wurzelhalsbereich früher als bei WT Pflanzen Prozesse in Gang gesetzt worden, um sekundäre Wurzelmeristeme zu initiieren. Diese könnten an der Kallusbildung an den Explantaten beteiligt sein.

Die Kallusbildung an Wurzelexplantaten auf KS-Medium gibt weitere Hinweise auf die Veränderungen in der Wurzel. Die Kalli bilden sich an mehreren Stellen der Wurzelexplantate aus, dies zeigt, dass der Ausfall von *TUP1* nicht auf das Wurzelmeristem beschränkt ist, sondern Kontrollfaktoren der Zellteilung, unabhängig vom Meristem betroffen sind. Die Kallusbildung konnte an Blattexplantaten und Sprossmeristemexplantaten nicht beobachtet werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass *TUP1* vornehmlich in der Wurzel und im Hypokotyl wirkt.

Die cytokininvermittelte *ARR5::GUS* Expression in *tup1* Kalli auf KS-Medium ist um ein vielfaches höher als in WT Kalli vergleichbarer Größe (Abbildung 38E,F). Dies weist auf eine erhöhte Cytokininkonzentration oder –sensitivität in den kallusbildenden Geweben hin. Die erhöhten Wachstumsraten der *tup1* Kalli bei steigenden Cytokininkonzentrationen, im Vergleich zu WT, deuten auf eine erhöhte Cytokininsensitivität hin. Zudem zeigten *tup1* Mutanten auf Medien mit hoher Cytokininkonzentration Kallusbildung am Wurzelhals. Interessanterweise ist jedoch die cytokininabhängige *ARR5::GUS* Expression in Wurzeln von *tup1* Mutanten und WT Pflanzen ähnlich; in den Wurzelmeristemen von *tup1* ist die Expression sogar etwas verringert.

Die Kalli, die sich an *tup1* Wurzel- und Hypokotylexplantaten bilden, zeigen noch weitere bemerkenswerte Charakteristika. Die Kalli sind schon nach 7 Tagen sichtbar, was auf eine hohe Zellteilungsrate in den Wachstumspunkten der Kalli und eine schnelle Entstehung nach Induktion durch das KS-Hormonmedium hinweist. Da die Kalli am Anfang ein kugeliges Aussehen haben, ist zu vermuten, dass eine oder wenige Initialzellen für das Entstehen des Kallus verantwortlich sind. Interessant ist auch, dass sich die Kalli vornehmlich an den Verwundungsstellen entwickeln. Das könnte bedeuten, dass neben der veränderten Hormonkonzentration noch ein weiterer Faktor notwendig ist, um die Kallusbildung zu

initiieren. An vielen Wurzel- und Hypokotylexplantaten bildeten sich Kalli außer an den Verwundungsstellen auch noch in weiteren Abschnitten des Gewebes. Dies kann jedoch auf eine Verletzung mit der Pinzette bei der Umsetzung auf das KS-Medium zurückzuführen sein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Kallusinduktion nicht in jedem Fall einer Verwundung bedarf. An der Oberfläche der Kalli lösen sich leicht einzelne Zellen ab (Abbildung 39F,G). Es ist vorstellbar, dass durch das Wachstum des Kallus die Zellverbände der äußeren Zellschichten aufbrechen, und es so zum Ablösen einzelner Zellen kommt. Histologische Untersuchungen an Wurzeln und Kalli könnten die veränderte Wurzelmorphologie und den Prozess der Kallusbildung weiter aufklären.

Bei den *tup1* Mutanten ist neben dem verringerten Wurzelwachstum auch das Sprosswachstum beeinträchtigt. Grund für das gedrungene Wachstum und die verringerte Blattoberfläche könnte die reduzierte Wurzel sein, da die Nährstoffversorgung nicht genügend gewährleistet ist. Dies wird auch für andere Wurzelmorphologiemutanten, z.B. für *stunted plant1* diskutiert (Baskin et al. 1992).

Betrachtet man den Phänotyp von *tup1* Mutanten, so weist die Inhibierung des Primärwurzelwachstums auf eine veränderte Cytokininsensitivität oder -konzentration in der Pflanze hin (Stenlid 1982; Medford 1989). Der Pflanzenphänotyp von *tup1* weist aber auch Merkmale auf, die gegen eine erhöhte Cytokininsensitivität sprechen. So wurde von Kuraishi und Okumura (1956) erstmals gezeigt, dass Cytokinine die Blattexpansion zu stimulieren. Die cytokininresistente Mutante *cyr1* hat eine verringerte Blattexpansion (Deikman und Ulrich 1995). *tup1* Blätter weisen auch eine verringerte Blattexpansion auf. Die Seneszenz der *tup1* Mutanten ist nicht deutlich verzögert, wohingegen jedoch *ipt*-transgene Tabakpflanzen eine verzögerte Blattseneszenz zeigen (Smart et al. 1992; Hewelt et al. 1994; Faiss 1996; Jordi et al. 2000). Erste Aufklärung über eine veränderte Hormonkonzentration in *tup1* Pflanzen können Messungen der endogenen Cytokininkonzentration geben, die z.Zt am Laboratory for Plant Growth Regulators, University of Olomouc, Tschechien bei Prof. Strnad durchgeführt werden.

Die Mutante *stunted plant1* (*stp1*) weist aufgrund ihres gedrungenen Wuchses und die verkürzte Primärwurzel einen ähnlichen Phänotyp wie *tup1* auf (Baskin et al. 1992, Baskin et al. 1995). Davon abgesehen gibt es jedoch wesentliche Unterschiede zwischen *tup1* und *stp1*. Beemster und Baskin (2000) konnten keine veränderte Cytokininsensitivität zwischen WT und *stp1* Kalli feststellen. *tup1* Kalli zeigten jedoch bei steigender Cytokininkonzentration ein stärkeres Kalluswachstum als WT Kalli. Auch wies die Primärwurzel von *stp1* im Gegensatz zu *tup1* keine sichtbar veränderte Wurzelmorphologie und keine gekrümmten Wurzelhaare auf.

5.2.1.2 Der Genotyp der *tup1* Mutante

Das Gen *TUP1* kartiert zwischen den Markern *ciw2* und *ciw3* auf Chromosom II in der Nähe des Centromer. Die stärkere Kopplung von *TUP1* zu *ciw2* ist ein Hinweis darauf, dass *TUP1* auf dem unteren Arm von Chromosom II liegt.

Da *tup1* eine veränderte Wurzelmorphologie aufweist, wurde die Kartierungsposition von *tup1* mit der von bekannten Wurzelmorphologiemutanten verglichen. So bildet die Mutante *short root1* (*shr1*) wie *tup1* eine verkürzte Wurzel, deren Wurzelmeristem nach zwei Wochen das Wurzelwachstum der Primärwurzel einstellt und vermehrt Adventivwurzeln initiiert (Benfey et al., 1993). Zudem zeigen beide Mutanten ein gedrungenes Wachstum. *short root1* wurde von Helariutta et al. (2000) kloniert und liegt auf Chromosom IV. Auch die Wurzelmorphologiemutanten *cobra*, *lions tail*, *sabre* (Benfey et al., 1993) und *root hair defective 3* (Wang et al., 1997) kartieren nicht auf Chromosom II sondern auf Chromosom I, III und V (<http://www.arabidopsis.org>). Die *cytokinin hypersensitive* (*ckh*) Mutanten von Kubo und Kakimoto (2000) haben einen gedrungenen Spross, verkürzte Primärwurzeln und bilden auf Medium mit niedriger Cytokinin/Auxinkonzentration grüne Kalli aus. Die Gene sind jedoch an anderer Stelle im Genom lokalisiert als *tup1*. *CKH1* liegt auf dem oberen Arm von Chromosom I zwischen den Markern *NCC1* und *g2395*, *CKH2* ist in der Mitte von Chromosom II lokalisiert, 1,2 cM von Marker *ER* (50 cM) entfernt.

5.2.2 Die *tup2* Mutante

5.2.2.1 Der Phänotyp der *tup2* Mutante

Das charakterisierende Merkmal der *tup2* Mutanten ist die erhöhte Fähigkeit, auf KS-Medium Sprosse aus Wurzel- und Hypokotylexplantaten zu regenerieren. Auch an Wurzelexplantaten der Mutante *altered meristem program1* (*amp1*) regenerieren sich Sprosse häufiger als an WT Explantaten, wenn sie auf Sprossinduktionsmedium kultiviert werden (Chaudhury und Signer 1989, Chaudhury et al. 1993). In den Vorversuchen konnte die erhöhte Sprossbildung von *amp1* auch auf KS-Medium nachgewiesen werden (Tabelle 4). Dabei entwickelten sich an *amp1* Wurzelexplantaten schon nach 5 Tagen Sprosse, bei *tup2* Wurzelexplantaten jedoch erst nach 3-4 Wochen. Die Konzentration von Dihydrozeatin ist in *amp1* um das vierfache, die von Zeatin sogar um das siebenfache erhöht. *amp1* zeigt auch andere typische Cytokinineffekte, wie reduzierte Apikaldominanz, verzögerte Seneszenz und erhöhte Blattrosettenbildung (Chaudhury et al. 1993). Nogue et al. (2000a, 2000b) konnten zeigen, dass die Cytokininsynthese und auch die Expression von *CycD3* in *amp1* Mutanten erhöht ist. Die *tup2* Mutante weist im Gegensatz zur *amp1* Mutante neben

der erhöhten Sprossregeneration und einer Reduktion der Wurzellänge aber keine weiteren typischen Cytokinineffekte auf, die auf eine veränderte Cytokininkonzentration in der Pflanze hinweisen würden. Z. Zt werden die Cytokininkonzentrationen von *tup2* an der University of Olomouc, Tschechien von Prof. Strnad analysiert.

Auch die Expression des cytokinininduzierten *ARR5::GUS* Konstrukts in jungen und alten Sprosskalli von *tup2* weist auf keine veränderte Cytokininkonzentration in den *tup2* Mutanten hin (Abbildung 40A,B), denn sie ist vergleichbar mit den Expressionsdomänen des Sprossmeristem von WT Pflanzen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Ausfall von *TUP2* die Expression von *ARR5* nicht wesentlich verändert und an der erhöhten Sprossbildung von *tup2* andere noch unbekannte Faktoren beteiligt sind.

Die Mutanten *ckh1* und *ckh2* zeigten eine erhöhte Sprossregeneration von Wurzelexplantaten auf Medien mit niedriger Cytokinin/Auxin-Konzentration (Kubo und Kakimoto, 2000). Außerdem war die Bildung von Chloroplasten in den *ckh* Kalli erhöht. Die Zeatinkonzentration in *ckh* Mutanten war im Vergleich zu WT Pflanzen aber leicht verringert. Kubo und Kakimoto (2000) vermuten, dass *CKH1* und *CKH2* negative Regulatoren der Cytokinin-Signaltransduktion sind. Howell und Cary (1999) isolierten die vier Mutanten *enhanced shoot regeneration1-4 (esr1-4)*, die eine erhöhte Regeneration von Sprossen auf Sprossinduktionsmedium hatten. Doppelmutantenanalysen von *ckh1-ckh2* und *esr1-esr4* Mutanten mit *tup2* Mutanten könnten Hinweise darauf geben, ob *TUP2* in der gleichen Signalkette als negativer Regulator der Cytokinin-Signaltransduktion wirkt.

Sowohl Wurzel-, als auch Hypokotylexplantate von *tup2* regenerieren Sprosse bevorzugt an der dem Sprossmeristem zugewandten Seite (Abbildung 12). Cytokinine und Auxine sind Antagonisten bei der Kontrolle des Wachstums von Seitensprossen. Entfernt man die Apikalknospe, so kommt es zur Akkumulation von Cytokininen und nachfolgend zum Auswachsen der Seitenknospen, wohingegen eine Applikation von Auxin auf den Apikalstumpf die Cytokininkonzentration in den Seitenknospen verringert (Prochazka et al. 1977, Letham 1978, Harrison und Kaufman 1984). Eine erhöhte Cytokininkonzentration führt zum Austreiben von Seitensprossen (Sachs und Thimann 1964; Cline 1991). Es ist davon auszugehen, dass die ausgebildete Polarität in eine apikal-basale Achse in der Pflanze auch in den geschnittenen Explantaten aufrecht erhalten bleibt und die Induktion von Kallusgewebe und Sprossen begünstigt.

Die meisten *tup2* Blüten waren infertil. Nur in Einzelfällen kam es zur Ausbildung von Schoten mit keimungsfähigen Samen. Bei Untersuchung der Blüte zeigte sich, dass die Staubblätter nur vereinzelt Pollen tragen und dass zudem die Staubblätter eine reduzierte Länge aufweisen. Cytokinine sind an der Blütenentwicklung beteiligt. So konnte durch exogen applizierte und endogen erhöhte Cytokininkonzentration eine Fusion von

Blütenorganen verursacht werden (McHughen 1982, Estruch et al. 1993). Eine Reduktion der Staubblattlänge und der Pollenentwicklung ist bisher noch nicht beschrieben worden. Da es in Einzelfällen durch Selbstbestäubung zur Befruchtung von Blüten kam, besitzen Pollen von *tup2* Mutanten zumindest eine geringe Fertilität. Zusätzliche Kreuzungsexperimente zwischen heterozygoten *tup2* und WT Pflanzen sowie Pollenkeimungsversuchen könnten klären, ob die Verkürzung der Staubblätter und die geringe Pollenmenge allein für die hohe Infertilitätsrate der Blüten verantwortlich sind, oder ob auch der Pollen selbst eine reduzierte Fertilität besitzt.

5.2.2.2 Der Genotyp der *tup2* Mutante

Für *TUP2* konnte nur eine schwache Kopplung (27,5 cM) zum Marker *nga111* auf Chromosom I gefunden werden. Der näher am Centromer liegende Marker *nga280* zeigte keine Kopplung zu *TUP2*. *TUP2* liegt demnach zwischen *nga111* und dem unteren Chromosomenende. Der Marker *F12M21* auf dem oberen Chromosomenarm von Chromosom I zeigte eine ungewöhnlich hohe Rekombinationsfrequenz (81 cM). Auf Chromosom IV kam es zu ähnlich hohen Rekombinationfrequenzen, während auf Chromosom II, III und V die Werte im Bereich von 50 cM (± 10 cM) lagen. Es könnte sein, dass *Ler*-Pflanzen sensibler auf das KS-Medium reagieren, unter Kallusscreeningbedingungen z.T. die Fähigkeit zur Sprossbildung haben und dadurch bevorzugt selektioniert wurden. Dies würde auch die schwache Kopplung zu *nga111* erklären, die somit durch falschpositive Sprossbildungsphänotypen verfälscht worden wäre. Bei Hypersensitivitätstests an Wurzelexplantaten auf Kinetin- und 2,4D-haltigem Medium (Kubo et al., 2000) bildeten *Ler*-Explantate schon bei niedrigeren Kinetin-Konzentrationen (100 $\mu\text{g/l}$ Kinetin und 2,4D) grüne Kalli aus, als *Col-0* Explantate (Kallusbildung erst bei 250 $\mu\text{g/l}$ Kinetin und 100 $\mu\text{g/l}$ 2,4D). Außerdem konnte Rupp (1997) zeigen, dass verschiedene Ökotypen von *Arabidopsis* eine um den Faktor 10 bzw. 20 variierende Cytokininsensitivität bezüglich Suppression der Seitenwurzeln und Blattausbleichung haben. Durch Verwendung einer geeigneten Hormonmatrix für *Ler*-Explantate könnte versucht werden, optimierte Kallusscreening-Bedingungen zu ermitteln, die eine Sprossbildung bei *Ler* unter Screeningbedingungen verhindern. Sollte dies zu keinem Ergebnis führen, könnte die Kartierung mit Hilfe eines anderen Ökotypen (z.B. *Wassilewskaja* (WS)) durchgeführt werden.

Die Mutanten *ckh1* und *ckh2* zeigen, vergleichbar mit *tup2* ein reduziertes Wurzel- und Sprosswachstum, aber die *CKH* Gene sind nicht allelisch zu *TUP2*, denn *CKH1* wurde auf dem oberen Arm von Chromosom I zwischen den Markern *NCC1* und *g2395*, und *CKH2* in der Mitte von Chromosom II 1,2 cM von Marker *ER* entfernt lokalisiert. *TUP2* liegt auf dem

unteren Arm von Chromosom I, 28 cM von nga111 entfernt. Howell und Cary (1999) isolierten die vier Mutanten *enhanced shoot regeneration1-4 (esr1-4)*, die eine erhöhte Regeneration von Sprossen auf Sprossinduktionsmedium hatten. *esr1* und *esr4* wurden auf dem oberen Arm von Chromosom I lokalisiert, für *esr2* und *esr3* sind keine Kartierungspositionen bekannt (persönliche Mitteilung A. Cary). Eine verstärkte Sprossregenerationsfähigkeit von Wurzelexplantaten wurde auch bei *altered meristem program 1 (amp1)* beobachtet (Chaudhury et al. 1993). *amp1* wurde jedoch auf Chromosom III in der Nähe des Markers *cer7* lokalisiert. Die vermehrte Sprossbildung an Explantaten von *amp1* Mutanten kann möglicherweise auf die erhöhte endogene Cytokininkonzentration zurückgeführt werden. Eine Mutation in einem Cytokininoxidasegen (*AtCKX*) könnte möglicherweise auch zu einer erhöhten endogenen Cytokininkonzentration führen. Von den *AtCKX* Genen kartiert *AtCKX5* als einziges auf dem unteren Arm von Chromosom I bei ca. 119 cM. Es liegt somit in der Nähe des Markers nga111, der als einziger eine Kopplung zu *TUP2* aufwies. Eine Komplementationskreuzung von *tup2* Mutanten mit *Atckx5* Mutanten könnte prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den beiden Mutationen besteht. Außerdem könnte getestet werden, ob die *Atckx5* Mutante eine erhöhte Sprossregenerationsfähigkeit aufweist. Bisher konnte an *Atckx5* Mutanten allerdings noch kein sichtbarer Phänotyp beobachtet werden.

5.2.3 Die *tup3* Mutante

5.2.3.1 Der Phänotyp der *tup3* Mutante

Die Funktion von *TUP3* scheint eine bedeutende Rolle bei der Pflanzenentwicklung zu spielen, denn bei einem Ausfall von *TUP3* ist neben dem vergrößerten Wurzelsystem und einer Kallusbildung an Wurzel und Hypokotyl auch die Blattbildung und die Blütenentwicklung stark beeinträchtigt. *tup3* Mutanten entwickeln Kalli spontan an Wurzeln und am Hypokotyl nach ca. fünfwöchigem Wachstum *in vitro*. Dieser Phänotyp trat bei Wachstum auf Erde nicht auf. Bei der *tup3* Mutante geht der Kallusbildung ein verstärktes Wurzelwachstum voraus. Insbesondere die Anzahl an Lateralwurzeln nimmt in der weiteren Entwicklung des Wurzelsystems wesentlich stärker zu als bei WT. Auxine sind wesentlich an der Lateralwurzelbildung beteiligt (Hobbie und Estelle 1994). Die Mutante *rtysur1* zeigt wie *tup3* eine hormonunabhängige Kallusbildung an der Pflanze (Boerjan et al. 1995, Celenza et al. 1995, King et al. 1995, Lehman et al. 1996). Diese geht mit einer Erhöhung an freiem und konjugiertem IAA einher. Das *RTY* Gen (Golparaji et al. 1996) zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Tyrosinaminotransferasen. Eine Beteiligung an der Biosynthese von Auxinen wird diskutiert (Bartels, 1997). Eine weitere Mutante mit erhöhter

Lateralwurzelbildung ist *sur2* (Delarue et al. 1998). Auch *sur2* hat erhöhte endogene Auxinkonzentrationen, die jedoch im Gegensatz zu *sur1* nicht zur Ausbildung von Kalli führen. *SUR2* kodiert das Protein CYP83B1, das zur Genfamilie der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen gehört (Barlier et al. 2000). Für CYP83B1 wird eine Beteiligung an der Synthese von Auxinen diskutiert (Barlier et al. 2000). *tup3* hat ähnlich wie *sur1* im Dunkeln einen leichten Deetiolerungsphänotyp, mit leicht geöffneten Kotyledonen und einem verkürzten Hypokotyl. Im Gegensatz zu *sur1* kommt es jedoch bei *tup3* zur vermehrten Ausbildung von Wurzeln im Dunkel. Bisher sind meines Wissen noch keine Mutanten in der Literatur beschrieben worden, deren Wurzelwachstums im Dunkeln nicht gehemmt würde.

Die Wurzelmeristeme zeigen keine auffällig sichtbaren Unterschiede zu WT. Dafür kann man an differenziertem Wurzelgewebe eine Auflösung von Zellverbänden der Wurzel beobachten (Abbildung 40C,D). Die Wurzelepidermis stirbt ab, und die inneren Gewebe zeigen eine vermehrte Zellteilungsrate mit einer erhöhten cytokininabhängigen *ARR5::GUS* Expression.

Neben dem veränderten Wurzelsystem ist bei *tup3* die Ausbildung generativer Sprosse verzögert (Abbildung 36) und die Anzahl an Blättern erhöht (Abbildung 35). Die Blätter zeigen keine Kallusbildung aber auch hier scheint die Kontrolle der Zellteilung wie in der Wurzel gestört, denn *tup3* Blätter sind unregelmäßig gebuchtet und stärker gewellt als WT Blätter (Abbildung 20D,E). Auch wurde eine Reduktion der Blattvenen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies sind Hinweise auf eine unkontrollierte Zellteilungsrate und eine z.T. veränderte Zellteilungsebene bei der Blattbildung. Weiterführende histologische Analysen der Blätter können Aufschluss über Veränderungen in der Struktur der Zellverbände geben. Die Pollenbildung ist bei *tup3* Mutanten stark beeinträchtigt, denn es kommt nur vereinzelt zur Ausbildung von Pollen an den Staubblättern und die meisten Blüten sind infertil. In seltenen Fällen produzieren die Blüten reife Schoten. Die exogenen Faktoren, die die Fertilitätsrate in *tup3* Mutanten beeinflussten, sind jedoch nicht bekannt.

Die *tup3* Kalli zeigten bezüglich ihrer Fähigkeit Sprosse auf Sprossinduktionsmedium auszubilden eine verringerte Sensitivität gegenüber Cytokinin. So waren *tup3* Kalli selbst bei einem Cytokinin:Auxin-Verhältnis von 10:1 nicht in der Lage, Chlorophyll zu produzieren oder Sprosse auszubilden (Tabelle 7). Bei der Messung der Zunahme des Kallusgewichts in Abhängigkeit von der Cytokininkonzentration konnten auch keine Veränderungen im Kalluswachstum im Vergleich zu WT entdeckt werden. Die cytokininabhängige *ARR5::GUS* Expression in vierzehn Tage alten Keimlingen spricht jedoch gegen eine veränderte Sensitivität in *tup3* Mutanten, zumindest zu dem beobachteten Zeitpunkt, da

Die Ergebnisse der Messungen der Hormonkonzentrationen in *tup3* Mutanten, sowie die Messung der Reaktion auf Auxine könnte Aufschluß über eine Beteiligung von *TUP3* an der Signaltransduktion von Auxinen geben. Interessant wären auch Doppelmutantenanalysen mit Mutanten, die eine reduzierte Lateralwurzelbildung haben, um eine evtl. Beteiligung an der Kontrolle der Lateralwurzelbildung aufzuweisen. Die *alf3* und *alf4* Mutanten zeigen eine Arretierung bzw. einen Ausfall der Lateralwurzelbildung (Celenza et al. 1995). *AUX1*, das ein Permease-ähnliches Protein kodiert, könnte am Auxinimport sich teilender Perizykelzellen beteiligt sein und die Ausbildung von Lateralwurzeln fördern (Pickett et al. 1990, Bennett et al. 1996).

5.2.3.2 Der Genotyp der *tup3* Mutante

Der Marker *ciw2* zeigte eine signifikante Kopplung (15,7 cM) zum *TUP3* Locus. Die Kopplungsdaten zu *ciw3* (36 cM) weisen darauf hin, dass *TUP3* auf dem oberen Arm von Chromosom II nahe dem oberen Endes lokalisiert ist.

tup3 bildet Kalli an Wurzel und Hypokotyl und bildet vermehrt Lateralwurzeln aus. Die Mutante *sur1/ry* bildet, wenngleich auch wesentlich stärker als *tup3*, ebenfalls Kalli an Wurzel und Hypokotyl aus (Boerjan et al. 1995, Celenza et al. 1995, King et al. 1995, Lehman et al. 1996). *sur1* wurde auf dem unteren Arm von Chromosom II bei 35 cM kartiert und liegt somit ca. 30 cM von *tup3* entfernt, dass auf dem oberen Arm von Chromosom II liegt. Die *sur2* Mutante bildet auch vermehrt Lateralwurzeln aus und zeigt somit eine gewisse phänotypische Übereinstimmung, ist aber auf Chromosom IV bei 50 cM lokalisiert. Das Cytokininrezeptorgen *CRE1*, das allelisch zu *wooden leg (wol)* und zu *AtHK4* ist, wurde kürzlich kloniert (Mähönen et al. 2000, Inoue et al. 2001, Suzuki et al. 2001). Der *CRE1* Locus liegt auf dem oberen Arm von Chromosom II bei 3,7 cM; *tup3* wurde auch in diesem Bereich kartiert. Die *wooden leg (wol)* Mutante hat jedoch eine reduzierte Primärwurzel mit einer gestörten Entwicklung des Vaskularsystems (Mähönen et al. 2000), die zu einer vermehrten Adventivwurzelbildung führt. Auch der Sprossphänotyp ist nicht vergleichbar mit dem *tup3*. Komplementationskreuzungen und eine größere Kartierungspopulation könnten zeigen, ob *CRE1* und *TUP3* allelisch sind.

5.2.4 Charakterisierung der *tup4* und *tup5* Mutanten

Für *tup4* und *tup5* Mutanten wurden nur wenige phänotypische Charakterisierungen und noch keine Kartierung der beteiligten Loci durchgeführt, weshalb eine Interpretation der Mutanten verfrüht erscheint. Nachfolgend wird deshalb vornehmlich nur auf die herausragendsten Merkmale hingewiesen.

5.2.4.1 Die *tup4* Mutante

Das namensgebende Merkmal für *tup4* Mutanten ist die Ausbildung von Kalli an Wurzelexplantaten auf KS-Medium. Es wurde bisher nicht getestet, ob die Kallusbildung hormonabhängig oder -unabhängig ist. Der Kallus unterscheidet sich deutlich von *tup3* und *tup5* Kalli. Zwar ist er auch gelblich gefärbt und auf Wurzel- und Hypokotylexplantate beschränkt, aber im Gegensatz zu *tup3* und *tup5* bilden sich keine Wurzeln an den Kalli. Die Kalli zerfallen sehr leicht, was auf einen Defekt in der Zelladhäsion oder der Zellwand der sich bildenden Kalluszellen hinweist. Weitere Merkmale der *tup4* Mutante sind eine reduzierte Apikaldominanz, ein verzögerter Blühzeitpunkt und das Fehlen der heteroblastischen Blattbildung. Die Blätter in der Blattrosette weisen alle ungefähr die gleiche Größe und Form auf. WT Blätter von *Arabidopsis* haben eine veränderte Blattform und Blattgröße in Abhängigkeit von ihrem Alter.

5.2.4.2 Die *tup5* Mutante

Die Kallusbildung *in vitro* und *in planta* an *tup5* Mutanten und Explantaten zeigt phänotypische Ähnlichkeiten zu *tup3*. Entstehungsorte der Kalli an Wurzel und Hypokotyl sind die gleichen. Auch die Konsistenz und Oberflächenstruktur der Kalli ist vergleichbar. Der wesentliche Unterschied ist die vermehrte Wurzelbildung bei *tup3* Mutanten. *tup5* bildet mehr Adventiv- und Lateralwurzeln im Vergleich zu WT Pflanzen aus, jedoch wesentlich weniger als *tup3*. Die Adventiv- und Lateralwurzelbildung ist wahrscheinlich auf die nur wenige Millimeter lange Primärwurzel von *tup5* zurückzuführen. Auch bei anderen Wurzelmutanten mit einem Defekt in der Primärwurzel kommt es zu einer vermehrten Ausbildung von Sekundärwurzeln (Baskin et al. 1992, siehe auch *tup1* Mutante). Das Wachstum des Primärwurzelmeristems von *tup5* ist bei Kultivierung im Licht in seinem Wachstum stark beeinträchtigt, denn das Wurzelmeristem ist in Länge und Breite reduziert. Bei Wachstum im Dunkeln hingegen erreicht die Wurzellänge höhere Werte als WT. Eine Hemmung des Wurzelwachstums im Licht ist meines Wissens in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden. Weiterführende Experimente mit Wachstum der Keimlinge unter verschiedenen Lichtverhältnissen könnte aufklären, welches Photorezeptorsystem an der Hemmung des Wurzelwachstums beteiligt ist.

Bei *tup5* Mutanten wurden Komplementationskreuzungen mit *sur2* Mutanten (Delarue et al., 1998) durchgeführt, da *sur2* ähnliche phänotypische Merkmale wie *tup5* aufweist. So bilden sowohl *tup5* als auch *sur2* Pflanzen im Bereich des Hypokotyls 10 Tage nach Keimung vermehrt Adventivwurzeln aus. Außerdem werden an Hypokotylexplantaten beider Mutanten auf cytokininhaltigem Medium Kalli und Wurzeln gebildet (Delarue et al., 1998; Abbildung 26). Weil es bei allen Kreuzungen mit nachweislich heterozygoten *tup5* Mutanten und

homozygoten *sur2* Mutanten gelang, die F1 Generation zu komplementieren, kann gefolgert werden, dass *TUP5* und *SUR2* nicht allelisch sind.

5.3 Ausblick

Mit genaueren phänotypischen und histologischen Analysen, insbesondere zelllinien-spezifischen Markergenen und *in situ*-Lokalisationsexperimenten kann ein besserer Einblick in weitere beteiligte Faktoren eröffnet werden. Bei zwei der isolierten Mutanten (*tup1* und *tup2*) konnte ein verändertes Zellteilungs- bzw. Zelldifferenzierungsverhalten bei exogener Applikation von Cytokininen festgestellt werden. Zur Klärung, ob es sich dabei um eine veränderte Hormonsensitivität oder endogene Cytokininkonzentration in den Pflanzen handelt, müssen Hormonmessungen der Pflanzengewebe und weitere Hormonsensitivitätsmessungen angeschlossen werden. Die genetischen Faktoren, die zu den *tumor prone* Phänotypen führen können jedoch nur durch positionelle Klonierung der mutierten Gene genauer analysiert werden. Die Veröffentlichung der Sequenz des Arabidopsis Genoms (The Arabidopsis Gene Initiative, 2000) erlaubt eine zügige positionelle Klonierung der *TUP* Gene.

5.4 *Atckx* Insertionsmutanten

5.4.1 Isolierung der *Atckx* Insertionsmutanten

Ziel der Identifizierung von *Atckx* Insertionsmutanten und deren phänotypischer Analyse war die endogene Cytokininkonzentration in der Pflanze durch Ausschalten von Genen des Cytokininkatabolismus zu erhöhen und dadurch unter Umständen eine Gewebedifferenzierung zu verursachen. Darüber hinaus sollten Erkenntnisse zur Funktion der Cytokininoxidasen in *Arabidopsis thaliana* erhalten werden. Die Funktionalität von vier der sechs Mitglieder der AtCKX Genfamilie konnte erst vor kurzem gezeigt werden (Bilyeu et al. 2001, Werner et al. 2001). Es wurden zwei *Knock-out* Populationen mit Erfolg gescreent. Zum einen die *En-1 Knock-out*-Pflanzenpopulation von ZIGIA in Köln (Wisman et al. 1998) und zum anderen die T-DNA *Knock-out*-Linien der University of Wisconsin (USA) (Krysan et al. 1996, Krysan et al. 1999).

Es konnten insgesamt 7 *En1*-Insertionsmutanten in *AtCKX2*, *AtCKX3* und *AtCKX4* isoliert. Dabei lag jeweils pro *AtCKX* Gen mindestens eine Insertion in einem Exon und eine in einem Intron. Bei der nachfolgenden PCR-Analyse der Einzelpflanzen auf Homozygotie der jeweiligen Insertion konnte nur für eine der 7 Insertionslinien homozygote Einzelpflanzen identifiziert werden (Insertion im ersten Intron von *AtCKX4*, Abbildung 45, Tabelle 10). Eine

mögliche Erklärung ist die somatische Excision des autonomen *En1*-Transposons. Da die PCR auch geringste Mengen DNA amplifiziert, genügen wenige Excisionsereignisse pro Pflanze, um das Gen ohne Insert zu amplifizieren. Mit Hilfe von *Southern Blots* und nachfolgender Hybridisierung mit radioaktiven Sonden hätte die genetische Konstitution der Pflanzen bestimmt werden können, da in homozygoten Pflanzen, im Gegensatz zu heterozygoten Pflanzen, die DNA-Menge von den jeweiligen *AtCKX* Genen mit Insert wesentlich häufiger in der Pflanze vorliegen als diejenigen ohne Insert. Von dieser Analyse wurde jedoch abgesehen, da zu diesem Zeitpunkt die T-DNA *Knock-out* Populationen verfügbar waren, bei denen dieses Problem nicht auftrat (Krysan et al. 1996, Krysan et al. 1999).

Die stabile Insertion im ersten Intron von *AtCKX4* wies eine Besonderheit auf. Mit den genspezifischen Primern, die den Insertionsort und ca. 1,3 kb flankierender *AtCKX4* Sequenz amplifizierten, konnte ein ca. 4,3 kb großes PCR-Produkt isoliert werden. Nach Amplifikation der Insertion mit weiteren genspezifischen Primerpaaren konnte die Länge der Insertion auf ca. 3 kb geschätzt werden (Abbildung 45). Das *En1*-Transposon besitzt jedoch ursprünglich eine Länge von 8,3 kb. Damit fehlen dem *En1*-Transposon für die Excision wichtige Elemente, wodurch das Insert arretiert ist. Da die *En1*-Insertionslinien bis zu 20 Inserts pro Pflanze enthalten können, besteht natürlich die Möglichkeit, dass das verbliebene Fragment in *trans* ausgeschnitten wird. Dies ist jedoch nur möglich, falls sowohl die *left border*- und die *right border*-Sequenz des Inserts noch intakt ist. In der untersuchten *Atckx4* Insertionslinie waren bisher alle Insertionen arretiert.

T-DNA Insertionsmutanten haben mehrere Vorteile gegenüber den verwendeten Transposon-Insertionsmutanten. Im Schnitt finden sich in einer mit T-DNA transformierten Pflanze 1,5 Insertionen (Krysan et al. 1996), d.h. in ca. 50 % der Pflanzen liegt nur eine T-DNA Insertion vor. Daher kann in vielen Fällen auf Rückkreuzungen mit WT Pflanzen verzichtet werden. Ein Nachteil der T-DNA Kollektionen ist, dass aufgrund der niedrigen Insertionsfrequenz nur mit einer sehr großen Pflanzenpopulation eine Sättigungsmutagenese erreicht werden kann. Zudem ist es nicht möglich, wie bei Transposonlinien Revertanten zu isolieren und so einen auftretenden Phänotyp direkt der Insertion im jeweiligen Gen zuzuordnen.

Beim Screening der T-DNA Kollektion, die an der University of Wisconsin (Krysan et al. 1996) erstellt worden war, konnten anhand der PCRs mit gen- und T-DNA-spezifischen Primern in den Superpools und nachfolgender Sequenzierung 11 Insertionen in und in der Nähe der *AtCKX* Gene bestimmt werden. Für die Gene *AtCKX1* und *AtCKX6* wurde nur jeweils eine Insertion 600 bzw. 181 bp *downstream* des Stopcodons identifiziert. Für die Gene *AtCKX2-AtCKX5* wurden die Insertionen im *second round screen* bestätigt.

Interessanterweise gelang es nur für die Gene *AtCKX2*, *AtCKX3* und *AtCKX5* *Knock-out*-Einzellinien zu etablieren. Auch nach zweimaliger Durchführung der PCRs der 25 Neunerpools konnte die durch die PCR im *second round screen* identifizierte Insertion in *Atckx4* nicht wiedergefunden werden. Grund dafür könnte eine negative Selektion durch den Phänotyp sein, falls der Phänotyp Auswirkungen auf die Fertilität der Pflanzen hat, insbesondere wenn es sich um eine dominante Mutation handelt. Auf der Homepage der University of Wisconsin (USA) (<http://www.biotech.wisc.edu/>) wurde berichtet, dass 2-3% der Insertionslinien infertil sind. Grund dafür sind homologe Sequenzen von T-DNA Konstrukt und DNA-Abschnitten im Pflanzengenom, die in seltenen Fällen, für die Fertilität relevante Gene, durch *gene silencing* ausschalten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wären logistische Probleme bei der Erstellung der Insertionslinien, die in Einzelfällen keinen eindeutigen Zugriff auf die jeweiligen Samen mehr erlauben. Für *Atckx2* und *Atckx5* konnten bezüglich der T-DNA Insertion homozygote Einzelpflanzen isoliert werden. Für *Atckx3* hingegen wurden insgesamt 12 heterozygote Linien bestimmt und keine homozygote Linie. Die F1 Generation dieser heterozygoten Linien ist noch nicht durch PCR auf ihren Genotyp bezüglich der Insertion analysiert worden. Sie kann Aufschluss darüber geben, ob homozygote Einzelpflanzen tatsächlich fehlen. Es wurden aber zwei Vorversuche unternommen, um embryoletale Samen zu identifizieren. Zum einen wurden von drei heterozygoten *Atckx3* Pflanzen je 80 Samen zum Keimen auf MS-Medium ausgelegt. Da nahezu alle Samen keimten, ist es unwahrscheinlich, dass homozygote *Atckx3* Samen embryoletal sind. Auch die Untersuchung von Schoten der heterozygoten *Atckx3* Pflanzen Samen wiesen auf keine 1:3 segregierende Population embryoletaler Samen hin. Es besteht die Möglichkeit, dass die Pollen, die das defekte Gen tragen, infertil sind. Dadurch würden in der F1-Generation wiederum nur heterozygote *Atckx3* Pflanzen entstehen. Zudem können durch Kreuzungsversuche, bei denen WT Blüten mit Pollen von heterozygoten *Atckx3* Pflanzen bestäubt werden, Pollendefekte identifiziert werden.

5.4.2 Vorversuche zur phänotypischen Charakterisierung der *Atckx2*, *Atckx4* und *Atckx5* *Knock-out* Mutanten

Bei einer ersten phänotypischen Charakterisierung der *Atckx2*, *Atckx4* und *Atckx5* *Knock-out* Linien wurden die Pflanzen *in vitro* und auf Erde regelmäßig beobachtet. Es konnten keine auffälligen sichtbaren Veränderungen festgestellt werden. Auch eine Quantifizierung von Blattzahl und Wurzellänge zeigte keine signifikanten Unterschiede zu WT Pflanzen. Werner et al. (2001) wiesen in transgenen Tabakpflanzen, die das *AtCKX2* Gen unter der Kontrolle eines konstitutiv überexprimierenden 35S-Promotor trugen, eine Reduktion der 2iP-

Konzentration auf 31% der Konzentration in WT Pflanzen nach. Deshalb wurde in einem weiteren Experiment, die 2iP-Sensitivität von *Atckx2* Mutanten untersucht. WT und *Atckx2* Keimlinge, die zwei Wochen auf Medien mit verschiedenen 2iP-Konzentrationen gewachsen waren, zeigten ein vergleichbare Inhibierung des Wachstums der Primärwurzel.

Es konnte somit bisher kein Phänotyp für eine der *Atckx* Mutanten gefunden werden. Der nächste wichtige Schritt wäre nachzuweisen, dass die jeweiligen *AtCKX* Gene in den homozygoten Pflanzen nicht mehr exprimiert wird. Dies könnte durch *Northern blots* oder RT-PCR erfolgen. Eine *Western blot* Analyse könnte zudem klären, ob die *AtCKX* Proteine vollständig ausfallen oder ein verkürztes Protein gebildet wird. Nur wenn diese Analysen die *Knock-outs* der *AtCKX* Gene bestätigen, wäre es sinnvoll, weitergehende phänotypische Charakterisierungen anzuschließen, um schwache oder konditionelle Phänotypen sichtbar zu machen. Meissner et al. (1999) haben bei der Charakterisierung von Mutanten von *MYB* Transkriptionsfaktoren eine Kollektion von verschiedensten Umweltbedingungen zusammengestellt, um unter spezifischen Bedingungen, Phänotypen zu finden. 65 % der in *Arabidopsis* vorkommenden Gene sind Mitglieder einer der ca. 11600 Genfamilien (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Auch die 6 bisher annotierten *AtCKX* Gene bilden eine Genfamilie mit z.T. hoher Identität auf Aminosäuresequenzebene. Es ist daher nicht auszuschliessen, dass bei einem *Knock-out* von einem der *AtCKX* Gene dessen Funktion von einem oder mehreren der restlichen 5 *AtCKX* Gene zumindest teilweise übernommen und so kompensiert wird. Meissner et al. (1999) untersuchten 92 Gene einer großen Genfamilie von *MYB* Transkriptionsfaktoren und konnten für 26 der Gene *Knock-outs* etablieren. Es gelang ihnen jedoch nur in 5 *Knock-out* Linien einen Phänotyp zu identifizieren. Auch hier ist davon auszugehen, dass die Funktion einzelner Gene durch andere Gene der Genfamilie kompensiert werden kann. Doppel- und Mehrfachmutanten könnten durch Kreuzungen der isolierten *Atckx* Mutanten einen Teil der *AtCKX* Genfamilie ausschalten und so eine Kompensation verringern.

Es ist erwähnenswert, dass es nicht gelang, eine *Knock-out* Linie für *AtCKX1* zu finden. Es wurden neben der T-DNA *Knock-out* Population (ca. 60.000 Einzellinien) und den *En1*-Transposon Insertionslinien (ca. 3000 Einzellinien mit ca. 15.000 unabhängigen Insertionen) noch die SLAT-Linien (Tissier et al. 1999; ca. 43.200 unabhängige Insertionen) und via Datenbankrecherche bei der Firma Syngenta (ca. 116.000 isolierte Insertionssequenzen) nach *Knock-outs* in *AtCKX1* gesucht. Insgesamt wurden demnach über 200.000 unabhängige Insertionen ohne positives Resultat analysiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Mutation in *AtCKX1* letal ist, unter Umständen sogar dominant letal. Dies sind Indizien, dass *AtCKX1* eine wichtige Funktion in der Pflanze erfüllt. Deshalb wäre es sinnvoll, *Arabidopsis* mit *AtCKX*-Antisense Konstrukten zu transformieren, um so auf anderem Wege

AtCKX1 auszuschalten. Die Methode RNAi erlaubt durch *gene silencing* Gene und z.T. auch ganze Genfamilien auszuschalten (Dalmay et al. 2000). Außerdem könnten weitere *Knock-out* Populationen (z.B. Weigel et al. 2000) auf *Atckx1* Insertionslinien untersucht werden.

5.5 Ausblick

Die weitere Vorgehensweise dieses Projekts wird sich in mehrere Abschnitte untergliedern. Zuerst sollte durch *Northern Blot*, RT-PCR und *Western Blot* untersucht werden, ob die T-DNA Insertion zu einem vollständigen Ausfall der *AtCKX* Genfunktion in den *Atckx* Insertionslinien führt. Kann der Ausfall der Gene bestätigt werden, dann können die *Knock-out* Mutanten durch Anwendung verschiedenster Umweltbedingungen und exogener Faktoren auf konditionelle Phänotypen untersucht werden. Zudem sollten durch Kreuzungsexperimente Doppel- und Mehrfachmutanten erstellt werden, um über das Ausschalten mehrerer Mitglieder der *AtCKX* Genfamilie kompensatorische Effekte zu verringern. Nicht zuletzt könnten durch das Screenen weiterer *Knock-out* Populationen Insertionslinien für die restlichen *AtCKX* Gene erhalten werden. Beispielsweise wurde durch Datenbankrecherche der Firma Syngenta *Knock-out* Linien eine Insertion für *AtCKX6* identifiziert (Daten nicht gezeigt).

6 Zusammenfassung

Cytokinine und Auxine sind wichtige regulatorische Faktoren bei Zellteilung und Zelldifferenzierung von Pflanzen. Es konnten aber bisher nur wenige Faktoren identifiziert werden, die die Kontrolle dieser Hormone an Teilungs- und Differenzierungsprozessen in der pflanzlichen Zelle vermitteln. Die Isolierung von Mutanten mit einer veränderten Antwort auf Hormone ist ein vielversprechender Ansatz, um Einblick in die Signaltransduktionswege von Hormonen in Pflanzen zu erhalten. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, neuartige Mutanten zu isolieren, die in Abhängigkeit von niedrigen Cytokinin- und Auxinkonzentrationen einen Defekt in der Zelldifferenzierung – nämlich Kallus- oder Tumorbildung - zeigen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden aus EMS-induzierten Einzellinien kallusbildende Mutanten isoliert, die sich in zwei Klassen einteilen ließen. Die Mutanten der *altered shoot meristem (asm1-asm4)* Klasse entwickelten ein verändertes Sprossmeristem, welches Ähnlichkeiten zu den *tsd* Mutanten von Frank (1999) zeigte. Zudem erwies sich *asm1* als allelisch zu *tsd1*, weshalb der Schwerpunkt der weiterführenden Charakterisierung auf den *tumor prone* Mutanten lag.

Diese zweite Klasse der *tumor prone (tup1-tup5)* Mutanten bildete insbesondere an Wurzelexplantaten auf Medium mit niedriger Cytokinin- und Auxinkonzentration Kallusgewebe, das z.T. auch ein verändertes Differenzierungsverhalten zeigte. Es wurden unter 1400 gescreenten Einzellinien fünf monogenisch rezessive *tup* Mutanten identifiziert. Alle *tup* Mutationen werden monogenisch rezessiv vererbt. Die *tup1* und *tup2* Mutanten grenzten sich deutlich durch den konditionellen Kallus- bzw. Sprossbildungsphänotyp *in vitro* (Abhängigkeit von Cytokinin/Auxin im Medium) von den anderen *tup* Mutanten ab. So entwickelten *tup3* und *tup5* Mutanten spontan auch auf hormonfreiem Medium an Wurzeln und Hypokotyl Kalli. Diese Kalli bildeten, im Gegensatz zu den *tup1* und *tup2* Kalli, kein Chlorophyll. *tup4* konnte bisher, aufgrund noch ausstehender Daten, noch keiner der zwei *tumor prone* Klassen zugeordnet werden.

Die *tup1* Mutante bildet auf KS-Medium grüne Kalli an Wurzel- und Hypokotylexplantaten. Bei Wachstum auf Erde ist die Mutante durch einen gedrungenen Wuchs und eine in Wachstum und Morphologie stark beeinträchtigte Primärwurzel charakterisiert. Diese phänotypischen Merkmale weisen auf eine veränderte Cytokininkonzentration oder -sensitivität der *tup1* Mutante hin. Weitere Indizien hierfür sind das beschleunigte Wachstum von *tup1* Kalli bei steigender exogener Cytokininkonzentration, und das veränderte Expressionsmuster eines cytokininabhängig exprimierten *ARR5::GUS* Gens. Insbesondere wurde dieses Gen in allen Zellen neu gebildeter Kalli exprimiert, während die Expression im Wildtyp nur in einzelnen Zellen zu finden war.

tup2 Wurzelexplantate haben auf KS-Medium eine erhöhte Sprossregenerationsfähigkeit. Interessanterweise bildeten sich Sprosse vermehrt auf der basalen Seite des Wurzelexplantats. Die Analyse der *ARR5::GUS* Expression in der Mutante deutete jedoch nicht auf eine erhöhte Cytokininkonzentration oder –sensitivität hin. Das auffälligste Merkmal der *tup2* Pflanzen bei Wachstum auf Erde war eine stark verringerte Fertilität. Dabei waren insbesondere die Pollenmenge deutlich reduziert und die Staubblätter verkürzt.

Das *TUP3* Gen scheint eine wichtige generelle Funktion in der Pflanze zu haben, da die Wurzel-, Spross- und Blütenentwicklung bei Ausfall von *TUP3* beeinträchtigt ist. Dies führt zu einem pleiotropen Phänotyp, dessen herausragendste Merkmale die Entstehung von Kalli an Wurzel und Hypokotyl und die vermehrte Lateral- und Adventivwurzelbildung sind. Interessanterweise wachsen die Wurzeln auch im Dunkeln weiter. Dieses Phänomen ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden. Weitere Merkmale sind die vermehrte Blattbildung, die veränderten Blattformen und die geringe Fertilität. Die Kallusbildung der *tup3* Mutanten geht vor allem vom Vaskularsystem der Wurzel aus. Die *tup3* Kalli zeigen eine reduzierte Fähigkeit zur Differenzierung von Sprossen und auch das Kalluswachstums weist eine reduzierte Sensitivität gegenüber Cytokinin auf.

Die *tup4* Mutante wurde ebenfalls aufgrund der Kallusbildung an Wurzelexplantaten isoliert. *tup4* Pflanzen haben einen gedrungenen Wuchs und eine verringerte Apikaldominanz. Eine weiterführende phänotypische Charakterisierung steht noch aus.

Die *tup5* Mutante hat neben einem verkürzten Spross vor allem eine gestörte Wurzelentwicklung. Das Meristem ist im Vergleich zu WT verkleinert und Primär- und Sekundärwurzeln sind stark verkürzt. Nach vierwöchigem Wachstum *in vitro* bilden *tup5* Pflanzen an Wurzel und Wurzelhals Kallusgewebe aus. Der Kallus weist in Bezug auf Oberfläche, Farbe und Wachstumsgeschwindigkeit ähnliche Charakteristika wie die *tup3* Kalli auf. Allerdings werden an *tup5* Kalli weniger Wurzeln initiiert. Da die Wurzelentwicklung nur im Licht inhibiert wird, aber nicht im Dunkeln, ist davon auszugehen, dass an der Wurzelinhibierung ein noch genauer zu bestimmender Lichtsensor und eine damit zusammenhängende Signalkaskade beteiligt ist. Eine essentielle Komponente davon könnte durch die Mutation in *tup3* ausgefallen sein.

Loci der mutierten *tup1*, *tup2* und *tup3* Gene wurden mit Hilfe von SSLP-Markern bestimmt. *tup1* ist zwischen den Markern *ciw2* und *ciw3*, wahrscheinlich auf dem unteren Arm von Chromosom II lokalisiert. *tup3* zeigt die stärkste Kopplung zu *ciw2* am oberen Ende von Chromosom II, wohingegen *tup2* eine Kopplung zum Marker *nga111* aufwies, der auf dem unteren Arm von Chromosom I liegt.

Die *tumor prone* Mutanten stellen eine neue Klasse von Mutanten dar, die hormonabhängig oder –unabhängig Kalli ausbilden. Die weiterführende Charakterisierung der Mutanten und

die Klonierung der *TUP* Gene bietet die Möglichkeit, einen besseren Einblick in die komplexen Kontrollmechanismen von Zellteilung- und Zelldifferenzierung zu erhalten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden *Knock-out* Mutanten der *AtCKX2*, *AtCKX3*, *AtCKX4* und *AtCKX5* Gene aus *En1*-Transposon- und T-DNA-getaggten Mutantenkollektionen isoliert. Die Mutanten mit *En1*-Transposoninsertionen erwiesen sich, mit einer Ausnahme, als weniger geeignet für weitere Untersuchungen, da durch somatische Excision der *En1*-Transposons, die Identifizierung homozygoter Pflanzen mittels PCR nicht gelang. Nur bei einer Insertionslinie (*Atckx4*) konnten homozygote Pflanzen gefunden werden. Die Amplifikation eines verkürzten Fragments am Insertionsort deutete auf ein defektes und somit arretiertes Transposon hin. Für die Gene *AtCKX2*, *AtCKX3* und *AtCKX5* konnten Einzellinien isoliert werden, die jeweils eine T-DNA-Insertion im jeweiligen Gen trugen. Nur für die Gene *AtCKX2* und *AtCKX5* wurden jedoch homozygote *Knock-out* Pflanzen identifiziert. Für die untersuchte Insertion in *Atckx3* wurden hingegen nur hemizygote Individuen identifiziert, was als ein Hinweis auf eine gestörte haploide Phase der Gametogenese interpretiert wurde. In einer ersten phänotypischen Untersuchung konnten keine sichtbaren Veränderungen an den Mutanten gefunden werden. Die erhaltenen Insertionslinien bilden jedoch einen guten Ausgangspunkt zur Aufklärung der Rolle von Cytokininoxidasen in *Arabidopsis thaliana*.

7 Literatur

Aarts MG, Corzaan P, Stiekema WJ, Pereira A (1995) A two-element Enhancer-Inhibitor transposon system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **247**, 555-564.

Abel S, Nguyen MD, Theologis A (1995) The *PS-IAA4/5*-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* **251**, 533-549

Abel S und Theologis A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol* **111**, 9-17.

Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 5994-5998.

Armstrong J (1994) Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. *In* Mok DWS, Mok MC (hrsg.) Cytokinins. Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Boca Raton, 139-154.

von Arnim A, Deng XW (1996) A role for transcriptional repression during light control of plant development. *Bioessays* **18**, 905-910.

Ayadin F, Vissi E, Meszaros T, Miskolczi P, Kovacs I, Feher A, Dombradi V, Erdodi F, Gergely P, Dudits D (2000) Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G₂/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *Plant J* **23**, 85-96.

Bartel B (1997) Auxin biosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 49-64.

Bartel B und Fink GR (1994) Differential regulation of auxin producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6649-6653.

Barlier I, Kowalczyk M, Marchant A, Ljung K, Bhalerao R, Bennett M, Sandberg G, Bellini C The *SUR2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. 2000 Dec 19; 97(26): 14819-24.

Baskin TI, Betzner AS, Hoggart R, Cork A and Williamson RE (1992) Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Aust J Plant Physiol* **19**, 427-437.

Baskin TI, Cork A, Williamson RE, Gorst JR (1995) *STUNTED PLANT1*, a gene required for expansion in rapidly elongating but not in dividing cells and mediating root growth responses to applied cytokinin. *Plant Physiol* **107**, 233-243.

Beemster GTS and Baskin TI (2000) *STUNTED PLANT 1* mediates effects of cytokinin, but not auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**, 1718-1727.

Beinsberger SEI, Valcke RLM, Deblaere RY, Clijsters HMM, De Greef JA, Van Onckelen H (1991) Effects of the introduction of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA *ipt* gene in *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 plant cells. *Plant Cell Physiol* **32**, 489-496.

Bell CJ und Ecker JR (1994) Assignment of 30 Microsatellite Loci to the Linkage Map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144.

- Benfey PN, Linstead PJ, Roberts K, Schiefelbein JW, Hauser MT, Aeschbacher RA** (1993) Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119**, 57-70.
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA** (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 949-950.
- Bennett MJ, Kieber J, Giraudat J, Morris P** (1998) Hormone regulated development. *In: Arabidopsis – Annual Plant Reviews* 1, Hrsg: Anderson M, Roberts JA, 107-150.
- Bertell G, Bolander E, Eliasson L** (1990) Factors increasing ethylen production enhance the sensitivity of root growth to auxins. *Phys Plant* **84**, 255-261.
- Bertell G und Eliasson L** (1992) Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene and indole-3-acetic acid. *Physiol Plant* **84**, 255-261.
- Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, Riekhof WR, Esparza TJ, Kramer MD, Morris RO** (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol* **125**, 378-386.
- Binns AN, Labriola J, Black RC** (1987) Initiation of auxin autonomy in *Nicotiana glutinosa* cells by the cytokinin biosynthesis gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta* **171**, 539-548.
- Binns AN** (1994) Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**, 173-196.
- Blonstein AD, Parry AD, Horgan R und King PJ** (1991) A cytokinin-resistant mutant of *Nicotiana plumbaginifolia* is wilty. *Planta* **183**, 244-250.
- Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M, Inzé D** (1995) *superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* **7**, 1405-1419.
- Bourquin M und Pilet PE** (1990) Effect of zeatin on the growth and indolyl-3-acetic acid and abscisic acid levels in maize roots. *Physiol Plant* **90**, 342-349.
- Brandstatter I und Kieber JJ** (1998) Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1009-1019.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ (Hrsg.)** (1997) *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*.
URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Campell BR und Town CD** (1991) Physiology of hormone autonomous tissue lines derived from radiation-induced tumors of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **97**, 1166-1173.
- Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spano L, Capone I, Costantino P** (1987) *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol Gen Genet* **209**, 475-480.
- Cary AJ, Liu W, Howell SH** (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075-1082.

- Celenza JL, Grisafi PL, Fink GGR** (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **9**, 2131-2142.
- Chaudhury AM, Signer ER** (1989) Relative regeneration proficiency of *Arabidopsis-thaliana* ecotypes. *Plant Cell Reports* **8**, 368-369.
- Chaudhury AM, Letham S, Craig S, Dennis ES** (1993) *amp1* - a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J* **4**, 907-916.
- Chin-Atkins AN, Craig S, Hocart CH, Dennis ES, Chaudhury AM** (1996) Increased endogenous cytokinin in the *Arabidopsis amp1* mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta* **198**, 549-556.
- Chylah-Arnason A und Tran Than Van M** (1968) Budding capacity of undetached *Begonia rex* leaves. *Nature* **218**, 493-495.
- Cline MG** (1991) Apical dominance. *Bot Rev* **57**, 318-358.
- Colon-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P** (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* **20**, 503-508.
- D'Agostino I, Deruere J, Kieber JJ** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family of cytokinin. *Plant Physiol* **124**, 1706-1717.
- Dalmay T, Hamilton A, Mueller E, Baulcombe DC** (2000) Potato virus X amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell* **12**, 369-379.
- Deikman J und Ulrich M** (1995) A novel cytokinin-resistant mutant of *Arabidopsis* with abbreviated shoot development. *Planta* **195**, 440-449.
- De Jager SM, Murray JA** (1999) Retinoblastoma proteins in plants. *Plant Mol Biol* **41**, 295-299.
- del Pozo JC und Estelle M** (1999) Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends in Plant Sci* **4**, 107-112.
- del Pozo JC, Timpte C, Tan S, Callis J, Estelle M** (1998) The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* **280**, 1760-1763.
- Delarue M, Prinsen E, Van Onckelen H, Caboche M, Bellini C** (1998) *Sur2* mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant J* **14**, 603-611.
- Dellaporta SL, Wool J, Hicks JB** (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Rep* **1**, 19-21.
- Dockx J, Kock P, Willemsen V, Weisbeek P, Smeekens S, Scheres, B** (1996) The role of the homeobox gene *KNAT2* in *Arabidopsis* development. 7th International Conference on *Arabidopsis* Research, Norwich, poster 196
- Dubois F, Bui Dang Ha, D, Sangwan RS, Durand J** (1996) The petunia *tra1* gene controls cell elongation and plant development, and mediates responses to cytokinins. *Plant J* **10**, 47-59.

- Estruch JJ, Granell A, Hansen G, Prinsen E, Reding P, VanOnckelen H, Schwarz-Sommer Z, Sommer H, Spena A** (1993) Floral development and expression floral homeotic genes are influenced by cytokinins. *Plant J* **4**, 379-384.
- Faiss M** (1996) Konditionelle Expression der Agrobakteriengene *ipt* und *rolC* in transgenen Tabakpflanzen und vergleichende Analyse des Cytokininmetabolismus. Universität Tübingen, Doktorarbeit.
- Faiss M, Zalubílova J, Strnad M, Schmölling T** (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J* **12**, 401-415.
- Faure JD, Vittorioso P, Santoni V, Fraisier V, Prinsen E, Barlier I, Van Onckelen H, Caboche M, Bellini C** (1998) The *PASTICCINO* genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. *Development* **125**, 909-918.
- Feinberg AP, Vogelstein B** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Feldmann KA** (1991) T-DNA-insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J* **1**, 71-82.
- Ferreira P, Hemerly A, Van Montagu M, Inzé D** (1994) Control of cell proliferation during plant development. *Plant Mol Biol* **26**, 1289-1303.
- Frank M** (1999) *TSD*-Gene als negative Regulatoren der meristematischen Aktivität von *Arabidopsis thaliana* (L.) Henyh. Diss. Univ. Tübingen 1999.
- Frank M und Schmölling T** (1999) Cytokinin cycles cells. *Trends Plant Sci* **4**, 243-244.
- Frank M, Rupp HM, Prinsen E, Motyka V, Van Onckelen H, Schmölling T** (2000) Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of *Arabidopsis* with altered cytokinin and auxin content or signaling. *Plant Physiol* **122**: 721-730.
- Galweiler L, Guan C, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**, 2226-2230.
- Gan S und Amasino R** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988
- Garbers C, DeLong A, Deruere J, Bernasconi P, Söll D** (1996) A mutation in protein phosphatase-2a regulatory subunit-A affects auxin transport in *Arabidopsis*. *EMBO J* **15**, 2115-2124.
- Gaspar T** (1999) Tumors, neoplastic progressions and cancers in plants . *In*: Strnad M, Pec P, Beck E (hrsg.) *Advances in regulation of plant growth and development*. Peres Publishers, Prague, 183-192
- Gaudin V, Lunness PA, Fobert PR, Towers M, Riou-Khamalichi C, Murray JA, Coen E, Doonan JH** (2000) The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the *Cycloidea* gene. *Plant Physiol* **122**, 1137-1148.
- Gautheret RJ** (1942) Hétéro-auxines et cultures de tissus végétaux- *Bull Soc Chim Biol* **24**, 13-41.

- Golparaj M, Tseng TS, Olszewski N** (1996) The *ROOTY* gene of *Arabidopsis* encodes a protein with high similarity to aminotransferases. *Plant Physiol* **111** (2 SUPPL.), 114.
- Guilfoyle TJ, Ulmasov T, Murfett J** (1998) The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell Mol Life Sci* **54**, 619-627.
- Hadfi K, Speth V, Neuhaus G** (1998) Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* **125**, 879-887.
- Hamill JD** (1993) Alterations in auxin and cytokinin metabolism of higher plants due to expression of specific genes from pathogenic bacteria: a review. *Aust J Plant Physiol* **20**, 405-423.
- Hardtke CS und Berleth T** (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* **17**, 1405-1411.
- Harrison MA, Kaufman PB** (1984) The role of hormone transport and metabolism in apical dominance in oats. *Bot Gaz* **145**, 293-297.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN** (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* **101**, 555-567.
- Helliwell CA, Chin-Atkins AN, Wilson IW, Chapple R, Dennis ES, Chaudhury A** (2001) The *Arabidopsis* *AMP1* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell* **13**, in print.
- Hemerly AS, Ferreira P, de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G, Inzé D** (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**, 1711-1723.
- Hewelt A, Prinsen E, Schell J, Van Onckelen H, Schmülling T** (1994) Promoter tagging with a promoterless *ipt* gene leads to cytokinin-induced phenotypic variability in transgenic tobacco plants: implications of gene dosage effects. *Plant J* **6**, 879-891.
- Hobbie L, Timpte C, Estelle M** (1994) Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant Mol Biol* **26**, 1499-1519.
- Hooykaas PJJ, den Dulk-Ras H, Schilperoort RA** (1988) The *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6b is an *onc* gene. *Plant Mol Biol* **11**, 791-794.
- Houba-Hérin N, Pethe C, d'Alayer J, Laloue M** (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J* **17**, 615-626.
- Howell SH, Cary A** (1999) *Arabidopsis* mutants with enhanced responses to cytokinin. 42 (suppl), 49.
- Hull A, Vij R, Celenza J** (2000) *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *PNAS* **97**, 2379-2384.
- Howard A, Pelc SR** (1953) Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 1953, **6** (suppl.), 216-273.

- Imamura A, Hanaki N, Umeda H, Nakamura A, Suzuki T, Ueguchi C, Mizuno, T** (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA **95**, 2691-2696.
- Inoue T et al.** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. Nature **409**, 1060-1063.
- Jacobs T** (1997): Why do plant cells divide? Plant Cell **9**, 1021-1029.
- Jameson PE** (1994) Cytokinin metabolism and compartmentation. In: Mok DWS, Mok MC (hrsg.) Cytokinins. Chemistry, Activity and function. CRC Press, Boca Raton, 197-215.
- John PCL, Zhang K, Dong C, Diederich L, Whightman F** (1993) p34cdc2 related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation in tissue development, and stimulation of division by auxin and cytokinin. Aust J Plant Physiol **20**, 503-526.
- Jordi W, Schapendonk A, Davelaar E, Stoopen GM, Pot CS, De Visser R, Van Rhijn JA, Gan S, Amasino RM** (2000) Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12}-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. Plant, Cell and Environment **23**, 279-289.
- Jullien M, Leseur D, Laloue M, Caboche M** (1992) Isolation and preliminary characterization of cytokinin-resistant mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*. In: Kamínek M, Mok DWS, Zazimalova E (hrsg.) Physiology and biochemistry of cytokinins in plants, 157-162.
- Kakimoto T** (1996) CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. Science **274**, 982-985.
- Kakimoto T (2001)** Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:atp/adp isopentenyltransferases. Plant Cell Physiol **42**, 677-85.
- Kaminek M** (1992) Progress in cytokinin research. TIBTech **10**, 159-164.
- Kerstetter RA und Hake S** (1997) Shoot meristem formation in vegetative development. Plant Cell **9**, 1001-1010.
- Kim BC, Soh MS, Kang BJ, Furuya M, Nam HG** (1996) Two dominant photomorphogenic mutations of *Arabidopsis thaliana* identified as suppressor mutations of *hy2*. Plant J **9**, 441-456.
- Kim J, Harter K, Theologis A** (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. Proc Natl Acad Sci USA **94**, 11786-11791.
- King JJ, Stimart DP, Fisher RH, Bleecker AB** (1995) A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. Plant Cell **7**, 2023-2037.
- Konieczny A und Ausubel F** (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J **4**, 403-410.
- Kornneef M und Stam P** (1992) Genetic analysis. In: Koncz C, Chua NH, Schell J (hrsg.) Methods in *Arabidopsis* research. World Scientific Publishing, 83-99.
- Krysan P, Young JC, Tax F, Sussman MR (1996)** Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **93**, 8145-8150.

Krysan P, Young JC, Sussman MR (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 2283-2290.

Kubo M und Kakimoto T (2000) The *Cytokinin-hypersensitive* genes of *Arabidopsis* negatively regulate the cytokinin-signaling pathway for cell division and chloroplast development. *Plant J* **23**, 385-94.

Laureys F, Dewitte W, Witters E, Van Montagu M, Inzé D, Van Onckelen H (1998) Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett* **426**, 29-32.

Lehman A, Black R, Ecker J (1996) *HOOKLESS1*, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Cell* **85**, 183-194.

Letham DS (1978) Cytokinins in: Letham DS, Goodwin PB, Higgins TJV (Hrsg.), *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive treatise*. Vol. 1, Elsevier North Holland, Amsterdam, 205.

Letham DS (1994) Cytokinins as phytohormones—sites of biosynthesis, translocation and function of translocated cytokinin. *In*: Mok DWS, Mok MC (Hrsg.): *Cytokinins. Chemistry, activity and function*. CRC Press, Boca Raton, 155-166.

Leyser HMO, Lincoln CA, Timpfe C, Lammer D, Turner J, Estelle M (1993) The auxin resistance gene *AXR1* of *Arabidopsis* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **354**, 161-164.

Leyser HMO, Pickett FB, Dharmasiri S, Estelle M (1996) Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *Plant J* **10**, 403-413.

Li J und Chory J (1998) Preparation of DNA from *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology* **82**, 55-60.

Li Y, Hagen G, Guilfoyle TJ (1992) Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinin in specific tissues and organs. *Dev Biol* **153**, 386-395.

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

Lui H, Wang H, DeLong C, Fowke LC, Crosby WL, Fobert PR (2000) The *Arabidopsis* Cdc2a-interacting protein ICK2 is structuarally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity *in vitro*. *Plant J* **21**, 379-385.

Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible W-R (2000) Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* **123**, 795-805.

Magyar Z, Bakó L, Bögre L, Dedeoglu D, Kapros T, Dudits D (1993) Active *cdc2* genes and cell cycle phase-specific *cdc2*-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant J* **4**, 151-161.

Maher EP und Martindale SJB (1980) Mutants of *Arabidopsis* with altered responses to auxins and gravity. *Biochem Genet* **18**, 1041-1053.

- Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PNN, Helariutta Y** (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* **14**, 2938-2943.
- Martin T, Hellmann H, Schmidt R, Willmitzer L, Frommer WB** (1997) Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J* **11**, 53-62.
- Matthews, REF** (1997) *Fundamentals of plant virology*, Academic Press, Inc., San Diego.
- Maurel C, Barbier-Brygoo H, Spena A, Tempe J, Guern J** (1991) Single *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* **97**, 212-216.
- McHughen A** (1982) Inducing organ generation in vitro: sepal-petal structures from tobacco flower buds. *Can J Bot* **60**, 845-849.
- Medford JI, Horgan R, El-Sawi Z, Klee HJ** (1989) Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell* **1**, 403-413.
- Meins FJR** (1989) Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. *Annu Rev Genet*, 23395-408.
- Meins F JR, Foster R** (1986) A cytokinin mutant derived from cultured tobacco cells. *Dev Genet* **7**, 159-165.
- Meins F, Hansen CE** (1992) Elevated *trans*-zeatin riboside content is not required for the neoplastic growth of Ti plasmid-transformed tobacco cells. *In: Kaminek M, Mok DWS und Zazimalova E (Hrsg) Physiology and biochemistry of Cytokinins in plants*. SPB Academic Publishing, The Hague, 83-85.
- Meissner RC, Jin H, Cominelli E, Denekmap M, Fuertes A, Greco R, Kranz HD, Penfield S, Petroni K, Urzainqui A, Martin C, Paz-Ares J, Smeekens S, Tonelli C, Weisshaar B, Baumann E, Klimyuk V, Marillonnet S, Patel K, Wisman E, Bevan M** (1999) Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: Assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations on R2R3 MYB genes. *Plant Cell* **11**, 1827-1840.
- Meyerowitz EM** (1997) Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* **88**, 299-308.
- Millar JBA, Russell P** (1992) The *cdc25* M-pase inducer; an unconventional protein phosphatase. *Cell* **68**, 407-410.
- Mok MC** (1994) Cytokinins and plant development – An overview. *In: Mok DWS, Mok MC (Hrsg.): Cytokinins. Chemistry, activity and function*. CRC Press, Boca Raton, 155-166.
- Morris RO** (1995) Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. *In: Davies PJ (hrsg.) Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, 318-339.
- Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG, Cheikh NN** (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem Biophys Res Com* **255**, 328-333.
- Müller A** (1961) Zur Charakterisierung der Blüten und Infloreszenzen von *Arabidopsis thaliana*. (L.) Heynh. *Die Kulturpflanze* **9**, 364-393.

- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for plant growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**, 473-497.
- Nogué F, Jullien M, Mornet R, Laloue M** (1995) The responses of a cytokinin-resistant mutant is highly specific and permits a new cytokinin bioassay. *Plant Growth Reg* **17**, 87-94.
- Nogué F, Hocart C, Letham DS, Dennis ES, Chaudhury AM** (2000) Cytokinin synthesis is higher in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regulation* **32**, 267-273.
- Nogué F, Grandjean O, Craig S, Dennis ES, Chaudhury AM** (2000) Higher levels of cell proliferation rate and cyclin *CycD3* expression in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regulation* **32**, 275-283.
- Normanly J, Cohen JD, Fink GR** (1993) *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 10355-10359.
- Omura T, Morinaka T, Inoue H and Saito Y.** (1982). *Phytopathology* **72**, 1246.
- Ori N, Juarez MT, Jackson D, Yamaguchi J, Banowitz GM, Hake S** (1999) Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell* **11**, 1073-1080.
- Parry AD, Blonstein AD, Babiano M, King PJ, Horgan R** (1991). Abscisic-acid metabolism in a wilted mutant of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* **183**, 237-243.
- Pennazio S, Roggero P** (1998) Endogenous changes in cytokinin activity in systemically virus-infected plants. *Microbiologica* **21**, 419-426.
- Persinger SM und Town CD** (1991) Isolation and characterization of hormone-autonomous tumours of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **42**, 1363-1370.
- Pickett FB, Wilson AK, Estell M** (1990) The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol* **94**, 1462-1466.
- Pozo JC, Timpte C, Tan T, Callis J, Estelle M** (1998) The ubiquitin-related protein *rub1* and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* **280**, 1760-1763
- Prochazka S, Navratilova D, Blazkova J** (1977) Transport of benzyl-8-¹⁴C-adenine from roots into shoots of pea seedlings with regard to outgrowth of lateral buds. *Beitr Biol Pflanzen* **58**, 421.
- Przemeck GK, Mattsson J, Hardtke CS, Sung ZR, Berleth T** (1996) Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta* **200**, 229-237.
- Redig P, Schmölling T, Van Onckelen H** (1996) Analysis of cytokinin metabolism in *ipt* transgenic tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Plant Physiol.* **112**, 141-148.
- Reichheld JP, Chaubet N, Shen WH, Renaudin JP, Gigot C** (1996) Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13819-13824.

- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jaqmard A, Murray JAH** (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JM, Murray JA** (2000) Sugar control of the plant cell cycle : differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* **20**, 4513-4521.
- Romano CP, Cooper ML, Klee HJ** (1993) Uncoupling auxin and ethylene effects in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **5**, 181-189.
- Rouse D, Mackey P, Stirnberg P, Estelle M, Leyser HMO** (1998) Changes in auxin response from mutations in an *AUX/IAA* gene. *Science* **279**, 1371-1373.
- Ruegger M, Dewey E, Estelle M** (1997) Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* **9**, 745-757.
- Rupp HM** (1997) Herstellung von *ipt*-transgenen Pflanzen und Identifizierung von Mutanten zur Charakterisierung des Stoffwechsels und der Wirkung von Cytokinin in *Arabidopsis thaliana* (L.) Henyh. Diss. Univ. Tübingen 1997.
- Rupp HM, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmülling T** (1999) Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J* **18**, 557-563.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B** (1999) An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. *Cell* **99**, 463.
- Sachs T, Thimann KV** (1964) Release of lateral buds from apical dominance. *Nature* **201**, 939-940.
- Sachs T** (1986) Cellular interaction in tissue and organ development. *Symp Soc Exp Biol* **40**, 181-210.
- Sachs T** (1988) Epigenetic selection: An alternative mechanism of pattern formation. *J Theor Biol* **134**, 547-559.
- Sauter M** (1997) Differential expression of a CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins, and *cdc2* genes from rice during the cell cycle in response to gibberellin. *Plant J* **11**, 181-190.
- Sauter M, Mekhedov SL, Kende H** (1995) Gibberellin promotes histone H1 kinase activity and the expression of *cdc2* and cyclin genes during the induction of rapid growth in deepwater rice internodes. *Plant J* **7**, 623-632.
- Scheres B, Di Laurenzio L, Willemsen V, Hauser MT, Janmaat K, Weisbeek P, Benfey PN** (1995) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**, 53-62.

- Schiavone FM und Racusen RH (1997)** Unusual patterns of soatic embryogenesis in domesticated carrot: developmental effects of endogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cellular Differentiaiton* **21**, 53-62.
- Schmülling T (2001)** CREAM of cytokinin signalling: receptor identified. *Trends in Plant Science* **6**, 281-284.
- Schmülling T, Beinsberger S, de Greef J, Schell J, Van Onckelen H, Spena A (1989)** Construction of a heat-inducible chimeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. *FEBS Lett* **289**, 401-406.
- Schmülling T, Fladung M, Großmann K, Schell J (1993)** Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant J* **3**: 371-382.
- Sessions A, Nemhauser JL, McColl A, Roe JL, Feldmann KN (1997)** *ETTIN* patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**, 4481-4491.
- Skoog F, Miller CO (1957)** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* **11**, 118-131.
- Smart CM, Scofield SR, Bevan MW, Dyer TA (1991)** Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr* a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *Plant Cell* **3**, 647-656.
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JAH (1995)** A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**, 85-103.
- Sorrell DA, Copmbettes B, Chaubet-Gigot N, Gigot C, Murray JAH (1999)** Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol* **119**, 343-351.
- Southern E (1985)** Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Spiegel MR, Stevens LJ (1998)** *Statistics*. 3rd ed. Schaum's outline series.
- Springer P, McCombie W, Sundaresan V, Martienssen R (1995)** Gene trap transposon tagging of *PROLIFERA*, an *MCM2-3-5*-like gene in *Arabidopsis*. *Science* **268**, 877-880.
- Springer PS, Holding DR, Groover A, Yordan C, Martienssen RA (2000)** The essential Mcm7 protein *PROLIFERA* is localized to the nucleus of dividing cells during the G(1) phase and is required maternally for early *Arabidopsis* development. *Development* **127**, 1815-1822.
- Stenlid JC (1982)** Cytokinins as inhibitors of root growth. *Phys Plant* **56**, 500-506.
- Su W und Howell SH (1992)** The effects of light on hypocotyl elongation in *Arabidopsis* seedlings are independent and additive. *Plant Physiol* **108**, 1420-1430.
- Sun Y, Dilkes BP, Zhang C, Dante RA, Carneiro NP, Lowe KS, Jung R, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA (1999)** Characterization of maize (*Zea mays L.*) *Wee 1* and its activity in developing endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 4180-4185.

- Sun L und Goodman HM** (1996) *Arabidopsis* genes homologous to human putative tumor suppressor gene encoding Prohibitin play an important role in plant development. 7th International Conference on *Arabidopsis* Research, Norwich, poster 226
- Sussex IM** (1989) Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* **56**, 225-229.
- Sussman MR, Amasino RM, Young JC, Krysan Patrick J, Austin-Phillips S**, (2000) The *Arabidopsis* knockout facility at the University of Wisconsin-Madison. *Plant Physiol* **124**, 1465-1467.
- Suzuki T**, (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **42**, 107-113.
- Takei K, Sakakibara H und Sugiyama T** (2001) Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 26405-26410.
- Taniguchi M, Kiba T, Sakakibara H, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T** (1998) Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett.* **429**, 259-262.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Tian Q und Reed JW** (1999) Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development* **126**, 711-721.
- Timpte C, Wilson AK and Estelle M** (1994) The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* **138**, 1239-1249.
- Timpte C, Lincoln C, Pickett FB, Turner J, Estelle M** (1995) The *AXR1* and *AUX1* genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. *Plant J* **8**, 561-569.
- Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, Torres MA, Murphy G, Jones JD** (1999) Multiple independent defective Suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: A tool for functional genomics. *Plant Cell* **11**, 1841-1852.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**, 1865-1868.
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughann SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inzé D, May MJ, Sung ZR** (2000) The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* **12**, 97-110.
- Vittorioso P, Cowling R, Faure JD, Caboche M, Bellini C** (1998) Mutation in the *Arabidopsis* *PASTICCINO1* gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development. *Mol Cell Biol* **18**, 3034-3043.
- Vizier I, Thorlby G, Mulligan B** (1996) Classical mutagenesis and genetic analysis. *In*: Foster GD und Twell D (hrsg.) *Plant gene isolation: principles and practice*. John Wiley & Sons, 215-246.
- Vogel JP, Schuerman P, Woeste K, Brandstatter I, Kieber JJ** (1998a) Isolation and

characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics* **149**, 417-427.

Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ (1998b) Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthesis gene *ACS5* of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4766-4771.

Wang H, Lockwood SK, Hoeltzel MF, Schiefelbein JW (1997) The *ROOT HAIR DEFECTIVE3* gene encodes an evolutionarily conserved protein with GTP-binding motifs and is required for regulated cell enlargement in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **11**, 799-811.

Wang H, Qi Q, Schnorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* **15**, 501-510.

Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF, Chory J (2000) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**, 1003-13.

Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *PNAS* (in print).

Westhoff P und Kloppstech K (1996) Licht, Phytohormone und die innere Uhr als Induktoren und Modulatoren von Entwicklung. In: Westhoff P, Jeske H, Jürgens G, Kloppstech K, Link G: Molekulare Entwicklungsbiologie. Vom Gen zur Pflanze. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 83-116.

Wilson AK, Pickett FB, Turner JC, Estelle M (1990) A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol Gen Genet* **222**, 377-383.

Wisman E, Cardon GH, Fransz P, Saedler H (1998). The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol Biol* **37**, 989-999.

Witty CD and Hall RH (1974) A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Can J Biochem* **52**, 789-799.

Zhang K, Letham DS, John PCL (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* **200**, 2-12.

Herausgegeben im Eigenverlag von:

Michael Riefler

Deitmerstrasse 10

12163 Berlin

rieflerm@zedat.fu-berlin.de