

Funktionelle Untersuchungen von *FLORICAULA*  
und *KNOX*-Genen  
in *Eschscholzia californica* Cham.

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Andrea Scholz**  
geb. in Bochum

Mainz, Juli 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2008

Die Ergebnisse des Kapitels 3.3.1 sind Inhalt der folgenden Publikation:

WEGE S., SCHOLZ A., GLEISSBERG S., BECKER A. (2007): Highly Efficient Virus-induced Gene Silencing (VIGS) in California Poppy (*Eschscholzia californica*): An Evaluation of VIGS as a Strategy to Obtain Functional Data from Non-model Plants. *Annals of Botany* 100: 641-649

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Pflanzenmaterial.....	14
2.1.2 Verwendete Medien.....	14
2.1.3 Verwendete Oligonukleotide (Primer).....	16
2.1.4 Verwendete Plasmide.....	17
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.2.1 Isolierung genomischer DNA.....	18
2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA.....	18
2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	18
2.2.4 Reinigung von PCR-Produkten und enzymatischen Reaktionen.....	18
2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.2.6 Sequenzierung von PCR-Produkten.....	19
2.2.7 cDNA Synthese.....	19
2.2.8 Semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR).....	20
2.3 Gewebekultur und <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation	
von <i>Eschscholzia californica</i> .....	21
2.3.1 Sterile Aussaat.....	21
2.3.2 Kallusinduktion und somatische Embryogenese aus Keimlingen	
von <i>E. californica</i> .....	21
2.3.3 Screening der Hormonkonzentration.....	22
2.3.4 Einfluss der Temperatur auf die Embryogenese.....	22
2.3.5 Kombiniertes Hormon-Temperatur-Screening.....	22
2.3.6 Kallusinduktion und somatische Embryogenese aus Samen	
von <i>E. californica</i> .....	22
2.3.7 Regeneration somatischer Embryonen.....	23
2.3.8 Ti-Plasmide für die <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation	
von <i>E. californica</i> .....	23
2.3.9 Vektorkonstruktion.....	24
2.3.10 Herstellung und Transformation kompetenter <i>Agrobacterien</i> .....	25
2.3.11 Einsatz von Antibiotika bei der Gewebekultur von <i>E. californica</i> .....	25

---

2.3.12 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von Keimlingsexplantaten von <i>E. californica</i> .....	26
2.3.13 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von Samen von <i>E. californica</i> .....	26
2.3.14 Histochemischer Nachweis von $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in transgenem Gewebe von <i>E. californica</i> .....	27
2.3.15 PCR-Nachweis von transgenen Pflanzen .....	27
2.4 Untersuchung des Einflusses von Auxin auf die Blattentwicklung .....	28
2.4.1 Aussaat und Aufzucht von <i>E. californica</i> .....	28
2.4.2 Analyse der Transkriptmengen von <i>EcFLO</i> und <i>EcSTM</i> durch sqRT-PCR .....	28
2.5 Virus induziertes Gen Silencing (VIGS) .....	29
2.5.1 Vektoren .....	29
2.5.2 Vektorkonstruktion .....	30
2.5.3 Klonierung des Gens <i>Phytoen-Desaturase</i> aus <i>E. californica</i> .....	30
2.5.4. Aussaat und Anzucht von <i>E. californica</i> .....	31
2.5.5 Infektion von <i>E. californica</i> mit pTRV-Vektoren .....	31
2.5.6 Vergleichende Untersuchung des Einflusses einer Infektion mit pTRV- <i>EcFLO</i> und pTRV- <i>EcKNOX</i> auf die Blattentwicklung von <i>E. californica</i> ...	32
2.5.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	33
2.5.8 Statistische Auswertung der Blatt- und Fiederzahlen .....	33
2.5.9 Untersuchung der Transkriptmengen von <i>EcPDS</i> , <i>EcFLO</i> und <i>EcSTM</i> mittels sqRT-PCR .....	34
3. Ergebnisse .....	35
3.1 Gewebekultur und <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von Keimlingsexplantaten und unreifen Samen von <i>Eschscholzia californica</i> .....	35
3.1.1 Keimlingsexplantate .....	35
3.1.1.1 Kalluskultur und somatische Embryogenese .....	35
3.1.1.2 Screening der Hormonkonzentrationen .....	35
3.1.1.3 Einfluss der Temperatur auf die Embryogenesefähigkeit von Kallusgewebe .....	37
3.1.1.4 Kombiniertes Hormon-Temperatur-Screening .....	37
3.1.1.5 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von Keimlingsexplantaten .....	37

---

3.1.2 Unreife Samen.....	38
3.1.2.1 Kalluskultur und somatische Embryogenese .....	38
3.1.2.2 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation unreifer Samen .....	38
3.2 Der Einfluss von Auxin auf die Blattentwicklung von <i>Eschscholzia californica</i>	41
3.2.1 Phänotypische Veränderungen bei Hemmung des Auxintransports .....	41
3.2.2 Untersuchung der Expression von <i>EcFLO</i> und <i>EcSTM</i> bei Hemmung des Auxintransports.....	43
3.3 Virus Induziertes Gen Silencing (VIGS) in <i>Eschscholzia californica</i> .....	44
3.3.1 VIGS von <i>EcPDS</i> .....	44
3.3.1.1 Phänotypen.....	44
3.3.1.2 Analyse der Transkriptmenge von <i>EcPDS</i> .....	49
3.3.2 VIGS von <i>EcFLO</i> und <i>EcKNOX</i> .....	50
3.3.2.1 Phänotypen.....	50
3.3.2.2 Analyse der Transkriptmengen von <i>EcFLO</i> und <i>EcSTM</i> .....	53
4. Diskussion .....	55
4.1 Gewebekultur und <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von <i>Eschscholzia californica</i> .....	55
4.1.1 Somatische Embryogenese aus Keimlingsexplantaten .....	55
4.1.2 Somatische Embryogenese aus unreifen Samen.....	58
4.2 Der Einfluss von Auxin auf die Blattentwicklung von <i>Eschscholzia californica</i> .....	61
4.2.1 Der Einfluss von Auxin auf Blattpositionierung und -morphologie .....	61
4.2.2 Regulation von <i>EcFLO</i> durch Auxin.....	63
4.2.3 Regulation von <i>EcSTM</i> durch Auxin .....	64
4.3 Virus induziertes Gen Silencing (VIGS) in <i>Eschscholzia californica</i> .....	65
4.3.1 Silencing von <i>Phytoen-Desaturase (PDS)</i> .....	65
4.3.2 Die Rolle von <i>EcFLO</i> und <i>EcSTM</i> in der Blattentwicklung von <i>E. californica</i> .....	68
4.3.3 Die Evolution der genetischen Regulation von Fiederblättern innerhalb der Eudikotylen.....	70
5. Zusammenfassung .....	72
6. Literaturverzeichnis .....	73
Anhang .....	81

## 1. Einleitung

Gegenstand der entwicklungsbiologischen Forschung ist die Ontogenese von Organismen. Aus der vergleichenden Embryologie und Morphologie entstand die moderne, durch die Molekularbiologie geprägte Entwicklungsbiologie, die zunehmend, verschiedene Forschungsdisziplinen miteinander verknüpft (GILBERT 2003; CARROLL 2005). So können sowohl genetische als auch morphologische und physiologische Prozesse untersucht und in Beziehung zueinander gesetzt werden. Differenzierungsprozesse einzelner Organe können z. B. (elektronen)mikroskopisch beobachtet und mithilfe molekularbiologischer Methoden mit der zeitlichen und räumlichen Aktivität einzelner Gene korreliert werden. Die evolutionäre Entwicklungsbiologie (Evolutionary Developmental Biology, Evo-Devo), die seit Ende der 1990er Jahre als eigene Forschungsrichtung besteht, versucht zudem durch den Vergleich von Differenzierungsprozessen bestimmter Organe oder Strukturen in unterschiedlichen Verwandtschaftskreisen evolutionäre Tendenzen und Zusammenhänge, wie z. B. die Diversifizierung von Genfunktionen aufzuklären (GILBERT 2003). Die Forschung wird dabei hauptsächlich an einigen Modellorganismen durchgeführt, die sich z. B. durch einen kurzen Generationszyklus, gute Zugänglichkeit zu Methoden der genetischen Manipulation oder das Vorkommen vieler natürlicher Mutanten auszeichnen. Um Entwicklungsprozesse in einen phylogenetischen Kontext stellen zu können, ist es allerdings notwendig, Daten aus verschiedenen systematischen Gruppen zu erheben und in diesem Zusammenhang weitere Modellorganismen zu etablieren. Pflanzliche Modelle sind derzeit unter anderem *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae), *Antirrhinum majus* L. (Plantaginaceae), *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) und *Zea mays* L. (Poaceae).

Das Wachstum einer Pflanze, das im Gegensatz zu tierischen Organismen zeitlebens andauert, beruht auf der Aktivität von Meristemen, Teilungsgeweben, die aus pluripotenten Zellen bestehen (VERDEIL et al. 2007). Die beiden primären, bereits im Embryo etablierten Meristeme (LAUX & JÜRGENS 1997), das Sprossapikalmeristem und das Wurzelmeristem, bringen sämtliche Organe einer Pflanze hervor. Am Sprossapikalmeristem entstehen im vegetativen Zustand zunächst die Laubblätter. Der Wechsel des Apikalmeristems in die reproduktive Phase führt schließlich zur

Bildung von Blüten. Die Beteiligung und das Zusammenspiel der verschiedenen Gene an der Entwicklung der einzelnen Organkreise einer Blüte wird durch das von COEN & MEYEROWITZ (1991) etablierte „ABC-Modell der Blütenentwicklung“ beschrieben, das im Laufe der Jahre um weitere Gene ergänzt und erweitert wurde (z. B. THEISSEN 2001; THEISSEN & MELZER 2007). Die Vorgänge, die schließlich zur Anlegung von Blüten führen, sind äußerst komplex und werden sowohl durch genetische als auch durch äußere Faktoren, wie z. B. die Tageslänge gesteuert (MOURADOV et al. 2002). Auch die Entwicklung von Blättern, beruht auf der Aktivität verschiedener Gene und der Steuerung durch weitere Einflüsse.

Blätter sind durch seitliche Ausgliederungen des Apikalmeristems entstehende Organe, die in charakteristischer Folge angelegt werden und deren hauptsächliche Aufgaben in der Betreuung von Photosynthese und Transpiration liegen. Die Blätter der meisten Angiospermen sind bifacial, bestehen also aus einer Ober- und einer Unterseite, die sich anatomisch von einander unterscheiden. Die Grenze zwischen diesen beiden Seiten wird durch den Blattrand markiert. Die Blattformen sind durch eine große Vielfalt gekennzeichnet, wobei grundsätzlich zwischen einfachen bzw. ungefierten und gefiederten Blättern unterschieden werden kann. Fiederblätter bestehen im Gegensatz zu ungefierten Blättern, deren Spreite ganzrandig ist, aus einzelnen Einheiten oder Segmenten. Die Entstehung der einzelnen Segmente resultiert aus der Aktivität so genannter Randblastozone (HAGEMANN & GLEISSBERG 1996). Randblastozone sind Bereiche des Blattrandes, die während der Entwicklung des Blattes reembryonalisiert werden und für eine gewisse Zeitspanne organogenetische Kompetenz erlangen.

Auf molekularer Ebene wird die Entwicklung von Blättern durch das Zusammenspiel verschiedener Gene, häufig Transkriptionsfaktoren gesteuert. Sowohl die Initiierung einer Blattanlage als auch die Ausbildung der adaxialen und abaxialen Domänen eines Blattes werden durch das Exprimieren bzw. Reprimieren unterschiedlicher Gene gelenkt (Abb. 1.1). Auch die Entwicklung gefiederter und ungefierner Blätter unterliegt unterschiedlichen genetischen Programmen (BHARATHAN et al 2002; KIM et al. 2003). Derzeit sind zwei Gruppen von Genen bekannt, die neben ihrer konservierten Funktion in der Sprossachsenentwicklung eine direkte Beteiligung an der Entwicklung von Fiederblättern zeigen: *FLORICAULA*-artige Gene und Gene aus der *KNOX*-Genfamilie.



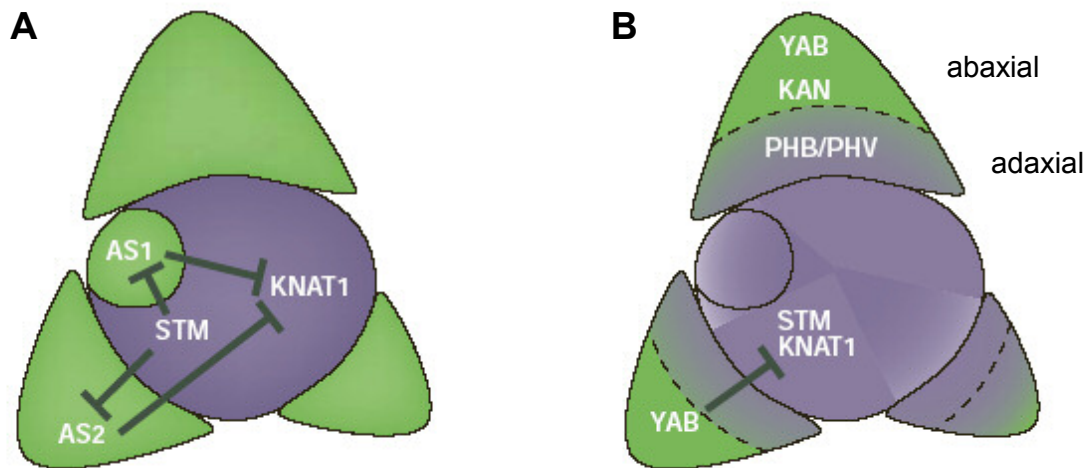


Abb. 1.1: Aktivität versch. Gene im Sprossspitze von *A. thaliana* (nach Tsiantis & Hay 2003)  
 A) Das *KNOX*-Gen *STM* wird im Apikalmeristem (lila) exprimiert, in Blattinitialen und -primordien (grün) aber reprimiert. *AS1* und *AS2* werden von *STM* negativ reguliert und nicht im Apikalmeristem exprimiert, regulieren aber ihrerseits andere *KNOX*-Gene wie *KNAT1* negativ und beschränken dessen Expression auf das Apikalmeristem.  
 B) *YAB* und *KAN* Gene tragen zur Ausbildung der abaxialen Domäne von Blättern bei. *YAB*-Gene reprimieren *KNOX*-Gene und unterbinden *KNOX*-Genexpression in Blättern und Blattinitialen. *PHB* und *PHV* legen dagegen die adaxiale Identität von Blättern fest und haben ein dynamisches Expressionsmuster in Apikalmeristem und Blattanlagen (lila).  
*AS*: *ASYMMETRIC LEAVES*; *KAN*: *KANADI*; *KNAT*: *KNOTTED* from *Arabidopsis thaliana*; *PHB*: *PHABULOSA*; *PHV*: *PHAVOLUTA*; *STM*: *SHOOT MERISTEMLESS*; *YAB*: *YABBY*

*KNOX*-Gene (*KNOTTED1*-like Homöobox) sind eine Familie von pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktoren, die ein hoch konserviertes DNA-Bindemotiv, die Homöobox, enthalten und vermutlich in allen Pflanzen vorkommen (SCOFIELD & MURRAY 2006). Das erste Gen der Familie, *KNOTTED-1*, wurde aus der gleichnamigen Mutante von *Z. mays*, die meristemartige Bereiche („knots“) entlang der Blattadern entwickelt und zum Teil starke, meristemassoziierte Deformierungen aufweist, isoliert (HAKE et al. 1989; VOLLBRECHT et al. 1991). Die Mitglieder der Genfamilie werden anhand ihrer DNA- und Aminosäuresequenzen in zwei Gruppen eingeteilt. Die class II *KNOX*-Gene weisen ein sehr generalisiertes Expressionsmuster auf und sind aufgrund fehlender Mutanten funktionell nicht charakterisiert (SERIKAWA et al. 1996; REISER et al. 2000; SCOFIELD & MURRAY 2006). Die class I *KNOX*-Gene weisen dagegen spezifischere Expressionsmuster auf und es existieren Mutanten, die eine Charakterisierung der Genfunktionen erlauben. Aus *A. thaliana* sind die vier class I *KNOX*-Gene *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*), *KNAT1*, *KNAT2* und *KNAT6* (*KNOTTED*-like from *Arabidopsis thaliana*) bekannt. Obwohl alle vier Gene unter anderem in spezifischen, zum Teil überlappenden

Bereichen des Sprossapikalmeristems exprimiert werden, ist aus Studien von Mutanten bekannt, dass *STM* das entscheidende *KNOX*-Gen in der Entwicklung des Sprossapikalmeristems ist (PAUTOT et al. 2001; DEAN et al. 2004; SCOFIELD & MURRAY 2006). *STM* ist durch Interaktion mit anderen Genen in die Aufrechterhaltung des embryonalen Zustands der Zellen des Apikalmeristems involviert. An Stellen der Organinitiierung und somit Determinierung der Zellen werden alle *KNOX*-Gene dagegen reprimiert und gelten somit als Marker für Organanlagen (TSIANTIS & HAY 2003). Während *KNOX*-Gene in der weiteren Entwicklung ungefiederter Blätter reprimiert bleiben, kommt es in den Primordien von Fiederblättern verschiedener untersuchter Arten dagegen zur erneuten *KNOX*-Genexpression in den Randblastozonen, den Bereichen also, die eine erhöhte Zellteilungsaktivität aufweisen und die einzelnen Segmente des Fiederblattes initiieren (BARATHAN et al. 2002). Die Phänotypen von Mutanten, die *KNOX*-Gene misexprimieren, belegen deren funktionelle Beteiligung an der Entwicklung der Fiederblätter. Überexpressionsmutanten von *Medicago sativa* L. und *Lycopersicon esculentum* weisen eine deutliche Steigerung, die Blätter der Funktionsverlustmutanten von *Cardamine hirsuta* L. dagegen eine Reduktion des Fiederungsgrades auf (Abb. 1.2.; HAREVEN et al. 1996; JANSSEN et al. 1998; HAY & TSIANTIS 2006; CHAMPAGNE et al. 2007).

*FLORICAULA*-artige Gene sind eine Gruppe von pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktoren, die in diploiden Angiospermen in der Regel als Einzelkopie vorliegen. *FLORICAULA* (*FLO*) wurde zunächst von COEN et al. (1990) aus *Antirrhinum majus* isoliert und als Blütenmeristemidentitätsgen charakterisiert. Durch den Verlust der *FLO*-Funktion werden anstelle von Blüten indetermierte Seitenachsen in den Achseln der Brakteen gebildet. Inzwischen sind *FLO*-Homologe aus allen taxonomischen Gruppen der Landpflanzen bekannt (MAIZEL et al. 2005). Mithilfe funktioneller Studien an den etablierten Modellpflanzen wurde festgestellt, dass die einzelnen *FLO*-Homologe weitere Funktionen ausüben, die in verschiedenen Pflanzen zum Teil divergieren. Die *FLO*-Gene aus *A. thaliana* und *L. esculentum*, *LEAFY* (*LFY*) und *FALSIFLORA* (*FA*), sind z. B. auch an der Regulation des Blühzeitpunktes beteiligt (WEIGEL & NILSSON 1995; MOLINERO-ROSALES et al. 1999), während das *FLO*-Homologe aus *Nicotiana tabacum* diese Funktion nicht hat (AHEARN et al. 2001). *LEAFY* fungiert des Weiteren als Aktivator verschiedener

homöotischer, an der Blütenentwicklung beteiligter Gene („ABC-Gene“) (PARCY et al. 1998; Ng & Yanofski 2001).

Auch die Expressionsmuster der *FLO*-Homologen variieren in verschiedenen Pflanzen sowohl im Bereich der Blüten als auch in vegetativen Sprossscheiteln (BECKER et al. 2005). In vegetativen Sprossscheiteln wird *FLO* in *A. majus* gar nicht, in anderen Pflanzen dagegen im Apikalmeristem und in Blattprimordien oder nur in Blattprimordien exprimiert. Die Expression von *FLO*-Homologen kommt in Blattprimordien unabhängig von der Blattform sowohl in Arten mit gefiederten als auch ungefiederten Blättern vor (z. B. *Arabidopsis thaliana*: BLAZQUEZ et al. 1997; *Pisum sativum*: HOFER et al. 1997; *Eucalyptus globulus*: SOUTHERTON et al. 1998; *Lycopersicon esculentum*: MOLINERO-ROSALES et al. 1999; *Populus trichocarpa*: ROTTMANN et al. 2000; *Vitis vinifera*: CARMONA et al. 2002; *Actinidia deliciosa*: WALTON et al. 2001; *Eschscholzia californica*: BUSCH & GLEISSBERG 2003). Die direkte Beteiligung von *FLO*-Homologen an der Blattentwicklung konnte für die Fiederblätter von *Lycopersicon esculentum*, *Glycine max* Merr. und *Pisum sativum* belegt werden. In Blattprimordien von *L. esculentum* wird das *FLO*-Homologe *FA* exprimiert. Funktionsverlustmutanten von *FA* weisen allerdings, einen sehr milden Blattphänotyp auf, der sich lediglich in einer geringfügigen Reduktion der Anzahl von Blättchen gegenüber dem Wildtyp äußert (MOLINERO-ROSALES et al. 1999). Der Phänotyp von Funktionsverlustmutanten des *FLO*-Homologen in *G. max* entwickelt anstelle der trifoliaten Blätter uni- oder bifoliate Blätter, deren Auftreten sich jedoch auf die unteren Nodi beschränkt (CHAMPAGNE et al. 2007). Der durch den Verlust des *FLO*-Homologen von *P. sativum*, *UNIFOLIATA (UNI)*, erzeugte Phänotyp ist dagegen nicht auf bestimmte Blätter einer Pflanze beschränkt. Die im Wildtyp von *P. sativum* aus mehreren Blättchen- und Rankenfiedern bestehenden Blätter werden in *UNI*-Funktionsverlustmutanten stark reduziert, so dass das Blatt im Extremfall ganzrandig ist (Abb. 1.2; HOFER et al. 1997, DEMASON & SCHMIDT 2001). Während *FLO* in *L. esculentum* neben dem *STM*-Homologen aus der *KNOX*-Genfamilie nur eine untergeordnete Rolle in der Blattentwicklung spielt, übernimmt das *FLO*-Homologe in *P. sativum* eine entscheidende Funktion, wobei die bisher aus *P. sativum* isolierten *KNOX*-Gene in Blattprimordien nicht exprimiert werden (HOFER et al. 2001). Expressionsstudien in Wildtypen und verschiedenen Blattformmutanten von *P. sativum* zeigen, dass *UNI* während der Differenzierung des Blattes aktiv ist und von

anderen, noch nicht molekular charakterisierten Genen, die offensichtlich an der Bildung der einzelnen Segmente des Blattes beteiligt sind, reguliert wird (HOFER et al. 1997; GOURLAY et al. 2000; DEMASON & SCHMIDT 2001).

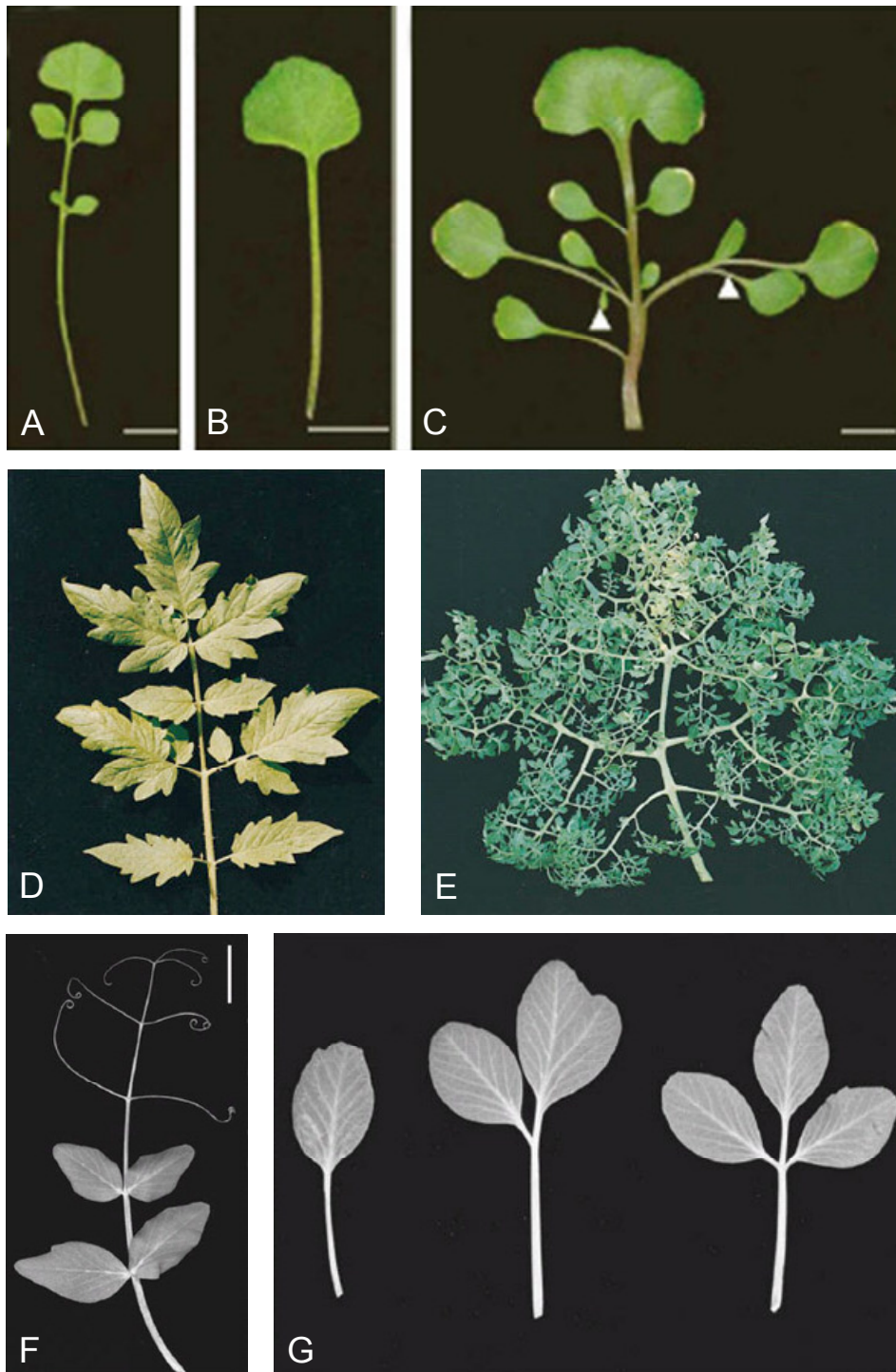


Abb. 1.2: Phänotypen von wildtypischen Blättern und von *KNOX*- bzw. *UNI*-Mutanten in *Cadarmine hirsuta* (A-C), *Lycopersicon esculentum* (D-E) und *Pisum sativum* (F-G); A) Wildtyp, B) Reduktion der Fiederung bei *KNOX*-Funktionsverlust, C) Steigerung der Fiederung bei *KNOX*-Überexpression, D) Wildtyp, E) Steigerung der Fiederung bei *KNOX*-Überexpression, F) Wildtyp, G) Reduktion der Fiederung bei *UNI*-Funktionsverlust (nach HAY & TSIANTIS 2006; HAREVEN et al. 1996; DEMASON & SCHMIDT 2001).

Sowohl *KNOX*- als auch *FLO*-artige Gene interagieren in einem Netzwerk von Genen und anderen Faktoren, durch deren Koordination Entwicklungsprozesse gesteuert werden. Bedeutende Elemente in diesem Netzwerk sind die Phytohormone. Es ist seit langem bekannt, dass das Phytohormon Auxin eine wichtige Rolle in pflanzlichen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen, wie z. B. der Positionierung von Blättern und Seitentrieben oder der Ausbildung der Leitgewebe spielt (LEFANU 1936; SNOW & SNOW 1937; SACHS 1975). Aktuelle Studien belegen die Interaktion von Auxin mit Genen wie *FLO* oder *KNOX*, die an Entwicklungsprozessen beteiligt sind. *KNOX*-Gene werden, wie Untersuchungen an *A. thaliana*, *Z. mays* und *L. esculentum* zeigen, von Auxin negativ reguliert. Auxin akkumuliert an Stellen des Apikalmeristems in einem definierten Abstand zum nächst älteren Primordium. An diesen Stellen werden *KNOX*-Gene reprimiert und neue Organe initiiert. Wird der Auxinfluss chemisch oder durch eine Mutation des zellulären Auxintransportsystems gestört, ist die Bildung fusionierter Organe bzw. die Einstellung der Organbildung zu beobachten (OKADA et al. 1991; REINHARDT et al. 2000; SCANLON 2003). Die für die Organinitiierung typischen Expressionslücken von *KNOX*-Genen existieren in Pflanzen mit gestörtem Auxintransport nicht (SCANLON 2003; HAY et al. 2004). Das *FLO*-Homologe *UNI* wird im Gegensatz zu *KNOX*-Genen durch Auxin positiv reguliert. Durch chemische Hemmung der Auxintransportproteine aus der *PINFORMED* (*PIN*)-Genfamilie werden in *P. sativum* Blätter erzeugt, die denen der *UNI*-Funktionsverlustmutanten ähnlich sind. Die Expression von *UNI* ist bei Hemmung des Auxintransports stark reduziert (DEMASON & CHAWLA 2004). Auch in *PINFORMED*-Funktionsverlustmutanten von *A. thaliana* gibt es Hinweise darauf, dass durch den gehemmten Auxintransport die Expression von *LFY* verändert wird (VERNOUX et al. 2000).

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Angiospermen durch ungefiederte Blätter gekennzeichnet war und Fiederblätter innerhalb der Angiospermen mehrfach unabhängig entstanden sind (DOYLE & ENDRESS 2000; BHARATHAN et al. 2002). Innerhalb der Angiospermen ist für eine Reihe von Arten aus der Gruppe der Eudikotylen (Abb. 1.3) die mit der Entwicklung von Fiederblättern einhergehende Expression von *FLO*- oder *KNOX*-Genen bekannt. Ob der letzte gemeinsame Vorfahre der Eudikotylen gefiederte oder ungefiederte Blätter hatte, unterliegt der Diskussion (BHARATHAN et al. 2002). Ebenso wird diskutiert, ob die molekulare Regulation der Fiederblattentwicklung in basal abspaltenden Taxa der Eudikotylen in Bezug auf *FLO*- und *KNOX*-Gene auf denselben Grundlagen beruht, wie in den übrigen Eudikotylen oder ob davon ausgegangen werden muss, dass es in der Evolution einer oder beider Genfamilien Veränderungen gab, die die Beteiligung der Gene in der Fiederblattentwicklung ermöglichten oder unterdrückten. Es ist sowohl möglich, dass die Fiederblattentwicklung in basal abspaltenden Eudikotylen entweder durch *FLO*- oder durch *KNOX*-Gene reguliert wird als auch, dass beide Gene beteiligt sind. Daher sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die molekularen Grundlagen der Fiederblattentwicklung von *Eschscholzia californica* (Papaveraceae) modellhaft für basal abspaltende Eudikotylen untersucht werden. Die Papaveraceae gehören zur Ordnung Ranunculales, die Schwestergruppe zu allen anderen Eudikotylen ist (Abb. 1.3; STEVENS 2001 onwards).

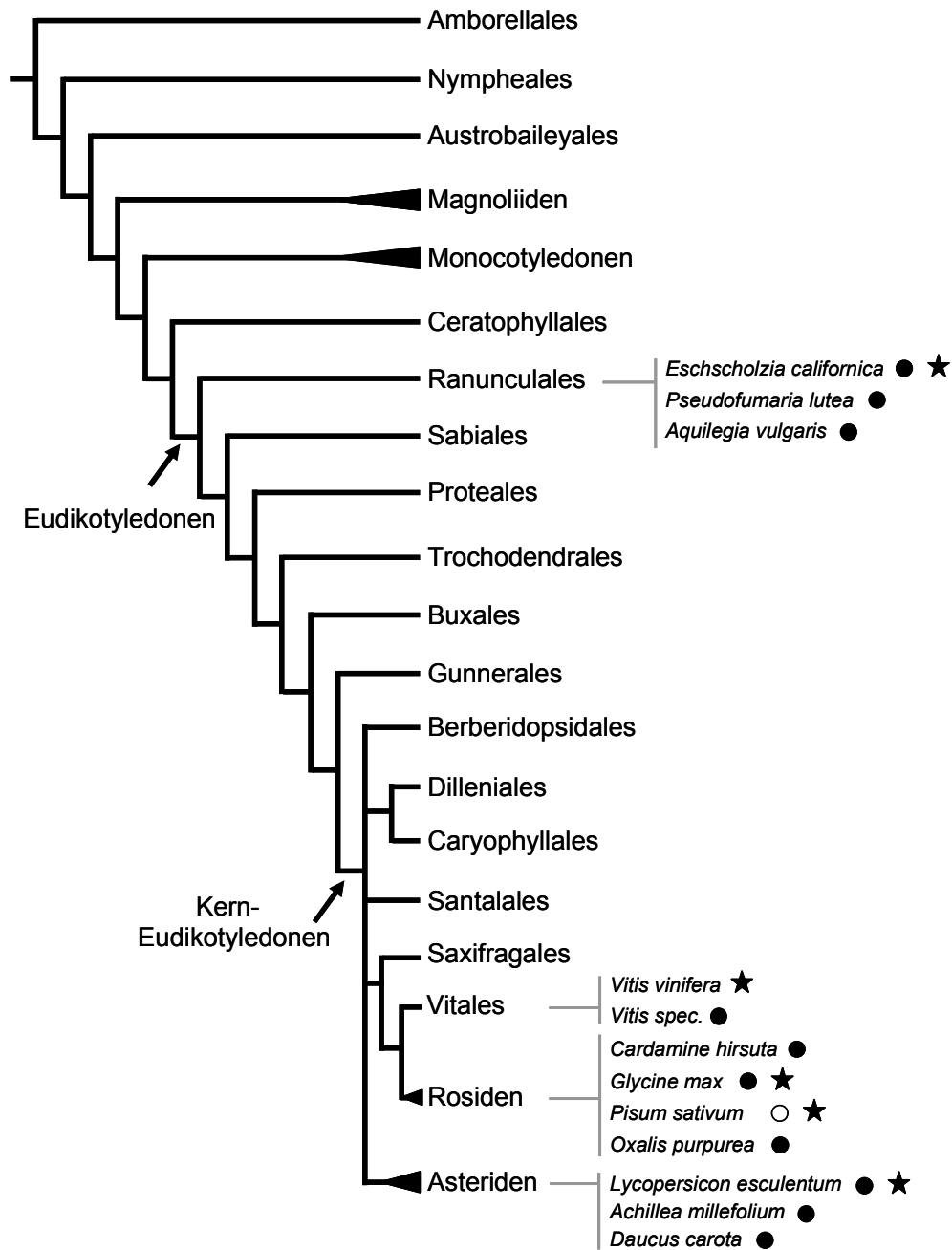


Abb. 1.3: Phylogenie der Angiospermen, vereinfachte Darstellung nach STEVENS (2001 onwards); Expression von *FLO* und *KNOX* während der Fiederbildung innerhalb der Eudikotylen (zusammengestellt nach HOFER et al. 1997; HOFER et al. 2001; BHARATHAN et al. 2002, CARMONA et al. 2002; BUSCH & GLEISSBERG 2003; GROOT et al. 2005; CHAMPAGNE et al. 2007).

★ *FLO*-Expression ● *KNOX*-Expression ○ keine *KNOX*-Expression in Fiederblattprimordien

In vorangegangenen Studien wurden sowohl ein *FLO*-Homologes als auch ein *KNOX*-Gen aus *E. californica* isoliert (*ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA FLORICAULA*, *EcFLO*: BUSCH & GLEISSBERG 2003; *ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA SHOOT MERISTEMLESS*, *EcSTM*: GROOT et al. 2005). Es wurde die Expression beider Gene in den Primordien der Fiederblätter an den Stellen der Fiederentwicklung nachgewiesen (Abb. 1.4). Um die Funktion der beiden Gene und deren Einfluss auf die Blattentwicklung funktionell zu charakterisieren, sollten die Expressionslevel dieser Gene moduliert werden. Mittels *Agrobacterium*-basierter Transformation sollten stabile Überexpressionsmutanten von *E. californica* erzeugt werden. Ein weiterer Ansatz sah die Untersuchung der Bedeutung von Auxin für die Entwicklung der Blätter und die Untersuchung der Interaktion von *EcFLO* und *EcSTM* mit Auxin durch chemische Hemmung des Auxintransports vor. Durch Virus induziertes Gen Silencing (VIGS) sollten die Auswirkungen des Funktionsverlustes der beiden Gene untersucht werden.

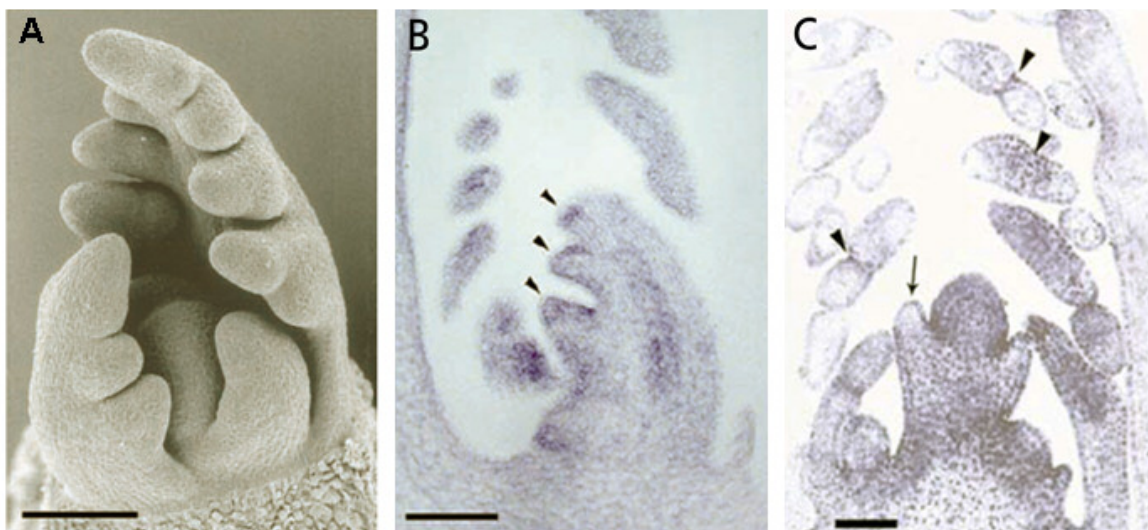


Abb. 1.4: Expression von *EcFLO* und *EcSTM*. A) REM-Aufnahme eines vegetativen Sprossscheitels mit Blattprimordien B) Längsschnitt durch vegetativen Sprossscheitel mit Blattprimordien, Expression von *EcFLO* an Stellen der Fiederanlage (Pfeilspitzen) C) Längsschnitt durch reproduktiven Sprossscheitel und Blattprimordien, Expression von *EcSTM* in Buchten benachbarter Fiedern (Pfeilspitzen) und im Blütenprimordium, Reprimierung von *EcSTM* in Sepalenprimordien (Pfeil); nach BUSCH & GLEISSBERG (2003); GROOT et al. (2005).



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Samen von *Eschscholzia californica* wurden von Lerner Seeds (Bollinas, Kalifornien, USA) bezogen und für die Nachzucht von April bis November im Freiland des Botanischen Gartens der Universität Mainz kultiviert.

#### 2.1.2 Verwendete Medien

Medien für die Kultur von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*:

##### LB-Medium:

Trypton 10 g/l  
NaCl 10 g/l  
Hefeextrakt 5,0 g/l  
pH 7,0

##### LB-Agar:

LB-Medium mit  
Agar 20 g/l

##### SOC-Medium:

Trypton 20,0 g/l  
Hefeextrakt 5,0 g/l  
NaCl 10,0 mM  
KCl 2,5 mM  
MgCl<sub>2</sub> 20,0 mM  
Glucose 20,0 mM  
pH 7,0

##### Antibiotika:

Ampicillin 70 µg/ml  
Kanamycin 50 µg/ml  
Gentamycin 50 µg/ml  
Rifampicin 25 µg/ml

Medien für die Kultur von *Eschscholzia californica* (Gamborg B5 Medium including Vitamins sowie Phyto Agar wurden von Duchefa, Niederlande bezogen):

Aussaat-Medium:

B5                3,164 g/l  
 Phyto Agar    8,0    g/l  
 pH 5,8

Callus/Embryo Induction Medium:

B5                3,164 g/l  
 Saccharose   30,0   g/l  
 Phyto Agar    8,0    g/l  
 pH 5,8

Zusätze:

NAA\*  
 BAP\*  
 Paromomycin 50 µg/ml  
 Timentin      200 µg/ml

Liquid Inoculation Medium:

B5                3,164 g/l  
 Saccharose   20,0   g/l  
 pH 5,8

B5-Medium:

B5                3,164 g/l  
 Saccharose   5,0    g/l  
 Phyto Agar    8,0    g/l  
 pH 5,8

Zusätze:

NPA             15 µM

Antibiotika, NAA (1-Naphthylelessigsäure), BAP (6-Benzylaminopurin), NPA (Naphthylphtalamsäure), MgCl<sub>2</sub>, und Glucose wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren des Mediums zugegeben.

\*Konzentration siehe jeweiliges Experiment

### 2.1.3 Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide (Operon), Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme kursiv

Primer	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> [°C]	Verwendung	Referenz
SP6	GCT ATT TAG GTG ACA CTA TAG	58	pGEM T-Vector, PCR, Sequenzierung	GLEISSBERG et al. unveröffentlicht
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	64	pGEM T-Vector, PCR, Sequenzierung	GLEISSBERG et al. unveröffentlicht
35S-F1	TGA TAT CTC CAC TGA CGT	55	pBI-Vektoren; PCR, Sequenzierung	CHEN et al. 2003
NOS-R1	ATC ATC GCA AGA CCG GCA	60	pBI-Vektoren; PCR, Sequenzierung	CHEN et al. 2003
TRV1-F1	GAA CAG TTC GGA TTA CAT TGA AGG	61	pTRV-RNA1, PCR, Sequenzierung	Diese Arbeit
TRV1-R1	CGT AGG CGA GGG GTT TTA CC	65	pTRV-RNA1, PCR, Sequenzierung	Diese Arbeit
TRV2-F1	CTG GGA GAT GAT ACG CTG TT	60	pTRV-RNA2, PCR, Sequenzierung	Diese Arbeit
TRV2-R1	ACT TCA GAC ACG GAT CTA CTT A	59	pTRV-RNA2, PCR, Sequenzierung	Diese Arbeit
Ath 18SFW	TTG TGT TGG CTT CGG GAT CGG AGT AAT	66	sqRT-PCR, Normalisierung	CHO & COSGROVE 2000
Ath 18SRV	TGC ACC ACC ACC CAT AGA ATC AAG AA	65	sqRT-PCR, Normalisierung	CHO & COSGROVE 2000
PDS-F1	CGG <i>TCT</i> AGA GCC ACT <i>MAA</i> CTT YAT AAA CC	66	EcPDS, Klonierung; <i>Xba</i> I-tail	Wege et al. 2007; Diese Arbeit
PDS-R1	CGG <i>GAG</i> CTC CTT CAG <i>TTT</i> TCT GTG AAA CC	69	EcPDS, Klonierung; <i>Sac</i> I-tail	Wege et al. 2007; Diese Arbeit
PDS-F2	TGG ATG ARA AAG CAG GGY GTW CC	65	EcPDS, sqRT-PCR	Wege et al. 2007; Diese Arbeit
PDS-R3	CCT TRC AAG TTA CWG ACA TGT CWG CA	64	EcPDS, sqRT-PCR	Wege et al. 2007; Diese Arbeit
EcL02R	GTT GAA TAT GCC ATC GAT ATC CCA ACC	65	EcFLO, sqRT-PCR	BUSCH & GLEISSBERG 2003
EcL08F	TGA ACC TGG AGA AGT GGC AC	62	EcFLO, sqRT-PCR	GLEISSBERG et al. unveröffentlicht
EcL05F	GCA ACA ACA ACA GAT AAT AAC GGG AGG	65	EcFLO, sqRT-PCR VIGS	BUSCH & GLEISSBERG 2003
EcL06R	TCT GGA TCT GCT ACA TCC TGT TCA ATC	65	EcFLO, sqRT-PCR VIGS	BUSCH & GLEISSBERG 2003
EcL22F	CCC GGG <i>TCT</i> AGA ATG GAT CCC GAC GCT TTC ACG GTG	77	EcFLO, Klonierung in pBI; <i>Sma</i> I/ <i>Xba</i> I- tail	Diese Arbeit
EcL23R	TAC GCA GAG CTC TAG AAG ACA TGC CCA GGC CCA GT	74	EcFLO, Klonierung in pBI; <i>Sac</i> I-tail	Diese Arbeit
EcL34F	GC <i>TCT</i> AGA-EcL08F	69	EcFLO, Klonierung, in pTRV2; <i>Xba</i> I-tail	Diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide

EcL35R	<b>AC GAG CTC TAG AAG</b> <b>ACA TGC CCA GGC</b> <b>CCA G</b>	73	EcFLO, Klonierung, in pTRV2; <i>SacI</i> -tail	Diese Arbeit
EcL36F	<b>TT TCT AGA AGG CAG</b> <b>GAG CTA GTT ACA</b> <b>TAA ACA AGC</b>	67	EcFLO, Klonierung, in pTRV2; <i>XbaI</i> -tail	Diese Arbeit
EcL37R	<b>TT GAG CTC -EcL02R</b>	69	EcFLO, Klonierung, in pTRV2; <i>SacI</i> -tail	Diese Arbeit
EcKN12F	<i>TCT AGA GTT TCT</i> <b>GAT TCT GTT GGT</b>	59	EcSTM, Klonierung in pTRV2; <i>XbaI</i> -tail	Diese Arbeit
EcKN13R	<i>GAG CTC CCT GTC</i> <b>TTC TGC TTG TGG</b>	68	EcSTM, Klonierung in pTRV2; <i>SacI</i> -tail	Diese Arbeit
EcKN14F	<i>TCT AGA-EcHBF125</i>	67	EcKNOX, Klonierung in pTRV2; <i>XbaI</i> -tail	Diese Arbeit
EcKN15R	<i>GAG CTC TCT TTT</i> <b>GCG ATT CCG AGG</b>	66	EcKNOX, Klonierung in pTRV2; <i>SacI</i> -tail	Diese Arbeit
EcKN10F	<b>CCG GAG GTG GTA</b> <b>GCT AAA TTA G</b>	63	EcSTM sqRT-PCR VIGS	GLEISSBERG et al. unveröffentlicht
EcHBR621	<b>CAA ACT GCA TTT</b> <b>CTT CAG ATG GCT</b> <b>TCC</b>	65	EcSTM, sqRT-PCR VIGS	GLEISSBERG et al. unveröffentlicht
EcHBF125	<b>AGT TCA TGG AAG</b> <b>CTT ACT GTG AGA</b> <b>TGC</b>	65	EcSTM, sqRT-PCR NPA	GROOT et al. 2005
EcHBR518	<b>TCT TTT GCG ATT CCG</b> <b>AGG GAT AAG GCC</b>	68	EcSTM, sqRT-PCR NPA	GROOT et al. 2005
dT Adaptor	<b>GAC TCG AGT CGA</b> <b>CAT CGA TTT TTT</b> <b>TTT TTT TTT TV</b>		cDNA-Synthese	FROHMAN & MARTIN 1989

### 2.1.4 Verwendete Plasmide

Tabelle 2.2: Ti-Plasmide zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation und für Virus induziertes Gen Silencing von *E. californica*.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pTRV1	VIGS Vektor, Ti-Plasmid mit RNA1 von TRV, Kan <sup>R</sup>	LIU et al. 2002a
pTRV2	VIGS Vektor, Ti-Plasmid mit RNA2 von TRV, Kan <sup>R</sup>	LIU et al. 2002a
pTRV-EcFLO1	pTRV-RNA2 mit 529 bp <i>XbaI</i> - <i>SacI</i> Fragment EcFLO	Diese Arbeit
pTRV-EcFLO2	pTRV-RNA2 mit 209 bp <i>XbaI</i> - <i>SacI</i> Fragment EcFLO	Diese Arbeit
pTRV-EcPDS	pTRV-RNA2 mit 407 bp <i>XbaI</i> - <i>SacI</i> Fragment EcPDS	Wege et al. 2007; Diese Arbeit
pTRV-EcSTM	pTRV-RNA2 mit 99 bp <i>XbaI</i> - <i>SacI</i> Fragment EcFLO	Diese Arbeit
pTRV-EcKNOX	pTRV-RNA2 mit 389 bp <i>XbaI</i> - <i>SacI</i> Fragment EcFLO	Diese Arbeit
pBI121	Ti-Plasmid mit Reportergen <i>uidA</i> , Par <sup>R</sup>	JEFFERSON et al. 1987; CHEN et al. 2003
pBI-EcFLO	pBI121, aber <i>uidA</i> ersetzt durch EcFLO ORF als 1251 bp <i>XbaI</i> - <i>SacI</i> Fragment	Diese Arbeit

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 Isolierung genomischer DNA**

Zur Isolierung genomischer DNA wurde frisches Blattmaterial von *E. californica* in flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

### **2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA**

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde in Abhängigkeit der Zielsetzung des Versuchs entweder Blattmaterial oder das Gewebe der Sprossspitzen verwendet. Das Material wurde direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und entweder bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert oder direkt pulverisiert und mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers inkl. DNase-Verdau aufgearbeitet,.

### **2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden 15 ml einer Übernachtskultur mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II (peqlab) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Ein Aliquot der Kultur wurde jeweils als Dauerkultur in 99,5 %-igem Glycerin bei -80 °C eingelagert.

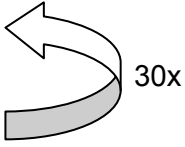
### **2.2.4 Reinigung von PCR-Produkten und enzymatischen Reaktionen**

Vor Verwendung in weiteren Reaktionen wurden PCR-Amplifikate sowie restringierte DNA-Fragmente gereinigt. Dazu wurden je nach Anwendung das QIAquick PCR Purification Kit oder das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

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

Ein 20 µl Reaktionsansatz einer Standard-PCR enthielt 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM je dNTP, 0,2 µM je Primer, einfach konzentrierten Reaktionspuffer, 1 U *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs), 0,5-1,0 µl DNA-Extrakt und Wasser ad 20 µl

(Wasser für die Molekularbiologie, Roth). Die PCR wurde in einem T-Gradient Thermocycler von Biometra nach folgendem Profil durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	
Annealing	[T <sub>A</sub> ]	30 sec	
Polymerisation	72 °C	1 min/kb Produkt	
Polymerisation	72 °C	5 min	

Zur anschließenden Bewertung der Qualität und Quantität der PCR-Produkte wurden diese auf einem 0,8 %-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.2.6 Sequenzierung von PCR-Produkten

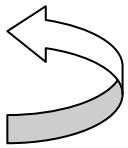
Sequenzierungen (Cycle Sequencing) von gereinigten PCR-Produkten und Plasmiden wurden mit dem BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Version 3.1 (Applied Biosystems) im T-Gradient Thermocycler (Biometra) für 30 Zyklen mit je 10 sec bei 96 °C und 4 min bei 55 °C durchgeführt. Ein 10 µl Reaktionsansatz enthielt 1 µM Primer, 2 µl BigDye-Premix, einfach konzentrierten Reaktionspuffer, DNA (60-100 ng) und Wasser ad 10 µl (Wasser für die Molekularbiologie, Roth). Die Reinigung und anschließende Elektrophorese der Proben mit einem ABI PRISM 3730™ Sequenzierer wurden von der Firma GENterprise Genomics (Mainz) durchgeführt.

### 2.2.7 cDNA Synthese

Die Erststrangsynthese von cDNA erfolgte mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen). Ein 20 µl Ansatz enthielt einfach konzentrierten Reaktionspuffer, 0,5 mM je dNTP, 1 µM dT Adaptor, 4 U Reverse Transkriptase, RNA (140-380 ng) und RNase-freies Wasser ad 20 µl. Waren Proben für eine vergleichende Untersuchung mittels sqRT-PCR (Kap) vorgesehen, wurden die in der cDNA Synthese einzusetzenden RNA Mengen zuvor mit Hilfe von spektrophotometrischen Messungen (Gene Quant II, Pharmacia) auf die jeweils gleiche Konzentration eingestellt. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37 °C im Thermocycler.

### 2.2.8 Semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR)

Die sqRT-PCR wurde eingesetzt, um Transkriptmengen von Genen in *E. californica* zu untersuchen. Der Einsatz gleicher Ausgangsmengen von RNA in den verschiedenen Proben einer Versuchsreihe wurde durch die Normalisierung der Proben gewährleistet. Dazu wurden für die Proben einer Versuchsreihe gleiche RNA Mengen in der cDNA Synthese eingesetzt (2.2.7) und zur zusätzlichen optischen Kontrolle ein Referenzgen aus allen Proben der jeweiligen Versuchsreihe amplifiziert. Um die exponentielle Phase der PCR zu ermitteln wurden nach verschiedenen Zyklen 5 µl Aliquots aus jeder Probe entnommen. Diese wurden zum optischen Nachweis gleicher Bandenintensitäten auf einem 0,8 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Entnahme der Aliquots zu erleichtern, wurde die Elongationszeit der entsprechenden Zyklen auf fünf Minuten erhöht. Nach Sicherstellen der einheitlichen Amplifikation des Referenzgens in der exponentiellen Phase der PCR wurden die gleichen Templatemengen in der PCR der jeweils zu untersuchenden Gene eingesetzt und ebenfalls nach verschiedenen Zyklen 5 µl Aliquots zum Vergleich der Bandenintensitäten in der exponentiellen Phase entnommen. Um durch Pipettierfehler entstehende Ungenauigkeiten zu minimieren, wurden puRE Taq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences) benutzt. Ein 25 µl Ansatz enthielt 0,2 µM je Primer, 1-2 µl cDNA und Wasser ad 25 µl (Wasser für die Molekularbiologie, Roth). Die PCR wurde für 35 Zyklen nach folgendem Profil durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	3 min		35x
Denaturierung	94 °C	1 min		
Annealing	60 °C	30 sec		
Polymerisation	72 °C	45 sec		
Polymerisation	72 °C	5 min		

Als Referenzgen wurde ein etwa 400 bp langes Fragment der 18S Untereinheit aus dem rDNA repeat benutzt, das mit den Primern 18S-FW und 18S-RV amplifiziert wurde (BUSCH & GLEISSBERG (2003), GROOT et al. (2005)). Die anschließende PCR wurde mindestens einmal wiederholt.

## **2.3 Gewebekultur und *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Eschscholzia californica***

Durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation sollten *EcFLO*-überexprimierende Mutanten von *E. californica* erzeugt werden. Ein von PARK & FACCHINI (2000a) veröffentlichtes Protokoll, das die Regeneration adulter Pflanzen über Kalluskultur und somatische Embryogenese vorsieht, diente als Grundlage.

### **2.3.1 Sterile Aussaat**

Die sterile Aussaat von *E. californica* erfolgte nach dem Protokoll von PARK & FACCHINI (2000a). Die Samen wurden 30 sec mit 70 %-igem Ethanol und 10 min mit handelsüblicher Chlorbleiche sterilisiert und anschließend fünfmal mit autoklaviertem Wasser gewaschen. Es wurden jeweils etwa 20 Samen pro Petrischale (Ø 9 cm) auf Aussaat-Medium (2.1.2.) aufgebracht und bei einer Temperatur von 23 °C mit einer täglichen Beleuchtungsdauer von 15 h zur Keimung gebracht.

### **2.3.2 Kallusinduktion und somatische Embryogenese aus Keimlingen von *E. californica***

Zur Kallusinduktion und somatischen Embryogenese aus Keimlingen von *E. californica* wurde zunächst das Protokoll von PARK & FACCHINI (2000a) unter Einsatz des Auxins NAA (1-Naphthyllessigsäure) und des Cytokinins BAP (6-Benzylaminopurin) angewendet. Die Hypokotyle und Keimblätter fünf Tage alter Keimlinge wurden in etwa 1 cm große Stücke zerteilt und diese auf Callus Induction Medium mit 10,7 µM NAA und 0,4 µM BAP bei 23 °C in Dunkelheit kultiviert. Nach vier Wochen wurden die Kalli auf Embryo Induction Medium mit 5,3 µM NAA und 2,2 µM BAP überführt. Da das Protokoll von PARK & FACCHINI (2000a) an dieser Stelle keine weiteren Angaben zu Temperatur- und Beleuchtungsverhältnissen sowie zur Kohlenstoffquelle macht, wurden verschiedene Bedingungen getestet. Das Embryo Induction Medium wurde mit 30 g/l Saccharose supplementiert und die weitere Kultur erfolgte zunächst bei 23 °C entweder in Dunkelheit oder mit einer täglichen Beleuchtungsdauer von 15 h. Da unter diesen Kulturbedingungen keine Embryogenese erreicht wurde, wurde der Einfluss der Hormonkonzentration und der Temperatur untersucht.



### 2.3.3 Screening der Hormonkonzentration

BAP wurde in den Konzentrationen 0/0,5/5/50  $\mu\text{M}$  mit NAA in den Konzentrationen 0/0,1/1/10/100  $\mu\text{M}$  kombiniert. Es wurden sowohl Keimlingsexplantate als auch Kallusgewebe, das zuvor auf Callus Induction Medium mit 10,7  $\mu\text{M}$  NAA und 0,4  $\mu\text{M}$  BAP induziert worden war, eingesetzt.

### 2.3.4 Einfluss der Temperatur auf die Embryogenese

Zunächst wurde Kallusgewebe auf Callus Induction Medium mit 10,7  $\mu\text{M}$  NAA und 0,4  $\mu\text{M}$  BAP induziert und nach vierwöchiger Kultur bei 23 °C in Dunkelheit auf Embryo Induction Medium mit 5,3  $\mu\text{M}$  NAA und 2,2  $\mu\text{M}$  BAP übertragen. Die weitere Kultur erfolgte bei 26 °C und einer täglichen Beleuchtungsdauer von 15 h.

### 2.3.5 Kombiniertes Hormon-Temperatur-Screening

In diesem Versuch wurde unter Einfluss fünf verschiedener Hormonkonzentrationen (0,4  $\mu\text{M}$  BAP/0  $\mu\text{M}$  NAA; 0,4  $\mu\text{M}$  BAP/1  $\mu\text{M}$  NAA; 0,4  $\mu\text{M}$  BAP/10,7  $\mu\text{M}$  NAA; 0,4  $\mu\text{M}$  BAP/20  $\mu\text{M}$  NAA; 0  $\mu\text{M}$  BAP/10,7  $\mu\text{M}$  NAA) Kallusgewebe aus Keimlingsexplantaten erzeugt. Zusätzlich wurde zunächst die eine Hälfte der Explantate bei 23 °C kultiviert, die andere bei 26 °C. Nach einem Monat wurde das Kallusgewebe auf Embryo Induction Medium (5,3  $\mu\text{M}$  NAA/2,2  $\mu\text{M}$  BAP) übertragen und bei 26 °C und einer täglichen Beleuchtungsdauer von 15 h weiter kultiviert.

### 2.3.6 Kallusinduktion und somatische Embryogenese aus Samen von *E. californica*

Da die Embryogenese aus Kallusgewebe von Keimlingsexplantaten nicht reproduzierbar war, wurden Samen von *E. californica* auf ihre Fähigkeit zur Produktion von somatischen Embryonen untersucht. Dazu wurden verschiedene Hormonkonzentrationen und Samen in unterschiedlichen Reifestadien eingesetzt. Die Reifestadien wurden anhand der Länge der Kapseln festgelegt und in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe S	1,0 bis 2,0 cm
Gruppe M	2,5 bis 3,5 cm
Gruppe L	4,0 bis 5,5 cm

Die Kapseln wurden zunächst sterilisiert (2.3.1) und anschließend mit einem Skalpell der Länge nach aufgetrennt. Die Samen wurden herausgeschabt und auf Medien mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen (Tab 2.3) bzw. hormonfreiem Medium verteilt. Die Kultur erfolgte bis zur Entstehung von somatischen Embryonen in Dunkelheit bei 23 °C.

Tab. 2.3: Zur Kallusinduktion und somatischen Embryogenese aus Samen eingesetzte Hormonkonzentrationen

	NAA [ $\mu\text{M}$ ]	BAP [ $\mu\text{M}$ ]
<b>Konzentration 1</b>	10,7	0,4
<b>Konzentration 2</b>	10,7	1,0
<b>Konzentration 3</b>	10,7	2,0
<b>Konzentration 4</b>	5,3	2,2

### 2.3.7 Regeneration somatischer Embryonen

Nach der Induktion somatischer Embryonen erfolgte die weitere Kultur bei einer Temperatur von 23 °C und einer täglichen Beleuchtungsdauer von 15 h. Die Embryonen wurden vom Kallusgewebe getrennt und auf hormonfreies Medium in spezielle Kulturboxen (Magenta Vessel, Sigma-Aldrich) übertragen. Die Kultur wurde fortgesetzt, bis die Größe der Pflanzen etwa der Höhe der Kulturboxen entsprach (ca. 7 cm). Dann wurden die Pflanzen in mit Erde (je 20 % Torf, Litauentorf, Kokosfaser, Kompost, Bims/Sand) gefüllte Töpfe ( $\varnothing$  11 cm) gesetzt und bei einer Temperatur von 23 °C und einer täglichen Beleuchtungsdauer von 16 h weiter kultiviert. Um die Pflanzen langsam an die niedrigere Luftfeuchtigkeit außerhalb der Kulturboxen zu gewöhnen, wurden die Töpfe zunächst mit Glasgefäßen abgedeckt. Diese wurden alle drei bis vier Tage einige Zentimeter angehoben und nach etwa zwei Wochen entfernt.

### 2.3.8 Ti-Plasmide für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *E. californica*

Zur Etablierung der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von *E. californica* wurde der Vektor pBI121 (Tab. 2.2) mit dem Reportergen *uidA* benutzt, dessen Genprodukt  $\beta$ -Glucuronidase (*GUS*) durch Blaufärbung im histochemischen

Nachweis eine erfolgreiche Transformation des Gewebes anzeigt. Die Transkription von *uidA* unterliegt der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S Promoters. Zur Selektion transgener Pflanzen enthält der Vektor in der T-DNA Region ein Gen für eine Resistenz gegen Aminoglykosidantibiotika (Neophosphomycintransferase II, NPTII). Der Vektor wurde von A. Becker (Universität Bremen) zur Verfügung gestellt. Zur Untersuchung des Einflusses von *EcFLO* auf die Blattentwicklung von *E. californica* wurde auf der Grundlage von pBI121 der Vektor pBI-EcFLO zur Überexpression von *EcFLO* in *E. californica* erzeugt. Dazu wurde im Vektor pBI121 das Gen *uidA* durch den Open Reading Frame (ORF) von *EcFLO* ersetzt (Abb. 2.1.)

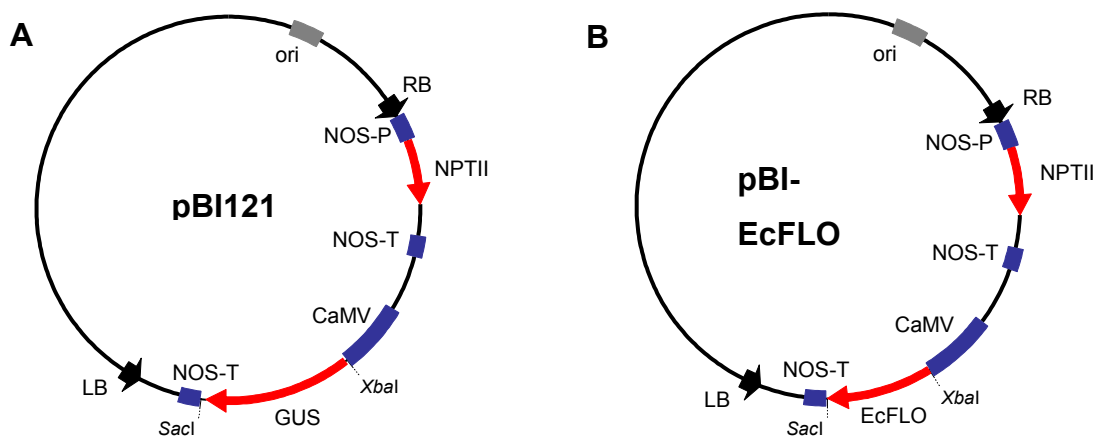


Abb. 2.1: Ti-Plasmide für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *E. californica*  
 A) pBI121 B) pBI-EcFLO; RB: right border, LB: left border, ori: origin of replication, NOS-P: Nopalinsynthese Promoter, NOS-T: Nopalinsynthese Terminator, NPT II: Neophosphomycintransferase II, CaMV: Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter, GUS:  $\beta$ -Glucuronidase, EcFLO: *Eschscholzia californica* FLORICAULA

### 2.3.9 Vektorkonstruktion

Zur Konstruktion des Vektors pBI-EcFLO wurde der *open reading frame* (ORF) von *EcFLO* (BUSCH & GLEISSBERG 2003) während der PCR-Amplifikation mit den Primern EcL22F und EcL23R mit künstlichen Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XbaI* und *SacI* versehen und anschließend durch Restriktion und Ligation als 1251bp *XbaI/SacI*-Fragment zwischen den CaMV 35S Promoter und den NOS-Terminator des Vektors pBI121 inseriert. Restriktionsenzyme und T4 DNA Ligase wurden von New England Biolabs bezogen. Restriktionsverdau wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Ligationen wurden entweder für einige Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend in *E. coli* JM109 (YANISH-PERRON et al. 1985) transformiert. Kompetente *E. coli* JM109 wurden von Promega bezogen. Für eine Transformation wurden 50  $\mu$ l kompetente

Zellen mit 2 µl des Ligationsansatzes für 20 min auf Eis, für 50 sec bei 42 °C und für 2 min auf Eis inkubiert und mit 950 µl SOC Medium für 90 min bei 180 Upm auf einem Schüttler kultiviert. Anschließend wurden je 50 µl und 100 µl auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmide wurden isoliert, durch PCR und Sequenzierung mit den vektorspezifischen Primern 35S-F1 und NOS-R1 verifiziert und in *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (KONCZ & SCHELL 1986) transformiert.

### **2.3.10 Herstellung und Transformation kompetenter Agrobacterien**

Zur Herstellung kompetenter Agrobacterien wurden je 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt, mit 0,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 28-30 °C und 180 Upm auf einem Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen für 10 min auf Eis gekühlt, zu je 25 ml aliquotiert und bei 3000 Upm und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Beckman J2-HS, JA-20 Rotor). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 1 ml eiskaltem sterilem 20 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Anschließend wurden je 100 µl der Suspension in gekühlte 2 ml Reaktionsgefäße gegeben und mit 1-2 µl Plasmid-DNA versetzt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff gefroren, sofort für 5 min bei 37 °C aufgetaut, mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 2 h bei 28-30 °C und 160 Upm auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Kulturen für 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus), der Überstand verworfen und die Pellets in je 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspensionen wurden jeweils auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen und für zwei Tage bei 28-30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Test auf positive Transformanten mittels PCR und vektorspezifischer Primer.

### **2.3.11 Einsatz von Antibiotika bei der Gewebekultur von *E. californica***

Vor Beginn der Transformationsexperimente mit *E. californica* wurde die Wirkung der einzusetzenden Antibiotika Paromomycin (Selektion von transgenem Gewebe) und Timentin (Abtöten von *Agrobacterium* nach der Transformation) auf das Pflanzengewebe untersucht. Fünf Tage alte sterile Keimlinge wurden geerntet, zerschnitten und zunächst für zwei Tage auf Callus Induction Medium ohne Antibiotika kultiviert. Anschließend wurden die Gewebestücke auf Medien

aufgebracht, die entweder Paromomycin (0, 10, 30, 50 oder 70 µg/ml) oder Timentin (0, 50, 100, 150, 200 oder 250 µg/ml) enthielten. Das Wachstum der Kulturen wurde über sechs Wochen beobachtet. Da Paromomycin das einsetzende Kalluswachstum ab einer Konzentration von 50 µg/ml innerhalb fünfwöchiger Kultur unterbindet, wurde diese Konzentration in Übereinstimmung mit dem Protokoll von PARK & FACCHINI (2000a) in den folgenden Transformationsexperimenten eingesetzt. Timentin zeigt dagegen keinen Einfluss auf die Vitalität des Gewebes und wurde ebenfalls gemäß dem Protokoll (PARK & FACCHINI 2000a) in einer Konzentration von 200 µg/ml eingesetzt.

### **2.3.12 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Keimlingsexplantaten von *E. californica***

Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Keimlingsexplantaten von *E. californica* wurde nach dem Protokoll von PARK & FACCHINI (2000a) durchgeführt. Es wurde der Stamm *A. tumefaciens* GV3101 benutzt. Für die Transformation wurden frische und durch PCR (Primer 35S-F1 und NOS-R1) verifizierte Einzelkolonien benutzt. Es wurden je 50 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 28-30 °C und 180 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen bei 1500 Upm für 10 min zentrifugiert (Beckman J2-HS, JA-20 Rotor). Die Pellets wurden in 25 ml Liquid Inoculation Medium resuspendiert. Die Hypokotyle und Keimblätter fünf Tage alter Keimlinge wurden in etwa 1 cm große Stücke zerschnitten und in der *Agrobacterium*-Lösung inkubiert. Nach 15 min wurden die Pflanzenstücke kurz auf sterilem Filterpapier getrocknet und dann auf Callus Induction Medium mit *A. tumefaciens* kokultiviert. Nach zwei Tagen erfolgte die Übertragung der Pflanzenstücke auf selektives Callus Induktion Medium. Vier Wochen nach der Transformation erfolgte die Übertragung auf selektives Embryo Induction Medium. Bei jeder Transformation wurde parallel Wildtypgewebe als Kontrolle auf den entsprechenden nichtselektiven Medien kultiviert.

### **2.3.13 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Samen von *E. californica***

Zur Transformation mit *A. tumefaciens* GV3101 wurden Samen verschiedener Reifestadien (2.3.6) benutzt. Nach dem Herauslösen aus den sterilisierten Kapseln

wurden die Samen mit einer Rasierklinge verletzt, in der *Agrobacterium*- Suspension (2.3.12) inkubiert und kurz auf sterilem Filterpapier getrocknet. Die Samen wurden für die Dauer von 6 h, 24 h oder 48 h mit *A. tumefaciens* kokultiviert und anschließend auf selektives Medium aufgebracht. Die Kultur erfolgte in Dunkelheit bei 23 °C.

#### **2.3.14 Histochemischer Nachweis von $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in transgenem Gewebe von *E. californica***

Um den Erfolg der Transformation von *E. californica* mit dem Vektor pBI121 nachzuweisen, wurde ein histochemischer Nachweis von  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in Kallusgewebe durchgeführt. Als Negativkontrolle diente Kallusgewebe von wildtypischen Pflanzen. Die einzelnen Kalli wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit einer Lösung aus 50 mM Natriumphosphatpuffer (0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2), 5 mM X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure) und 0,5 % Triton-X-100 überschichtet und im Exsikkator entgast. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit Alufolie umwickelt und über Nacht bei 37 °C auf einem Kippschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben zur Entfernung des Chlorophylls bei 37 °C mit 70 %-igem Ethanol inkubiert.

#### **2.3.15 PCR-Nachweis von transgenen Pflanzen**

Zum Nachweis der Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom wurde aus Blättern regenerierender somatischer Embryonen DNA extrahiert und eine PCR mit den Primern 35S-F1 und NOS-R1 durchgeführt (Tab. 2.1; 2.2.5). Als Negativkontrolle diente das entsprechende Gewebe wildtypischer Pflanzen.

## 2.4 Untersuchung des Einflusses von Auxin auf die Blattentwicklung

Es sollten der Einfluss von Auxin auf die Blattentwicklung und die Interaktion von Auxin mit *EcFLO* und *EcSTM* untersucht werden. Durch chemische Hemmung des Auxin Efflux Carriers *PINFORMED* mit NPA (Naphthylphthalamsäure) sollte der Auxintransport in *E. californica* unterbunden werden und die Auswirkungen dessen anschließend sowohl morphologisch als auch durch die Analyse der Transkriptmengen von *EcFLO* und *EcSTM* untersucht werden.

### 2.4.1 Aussaat und Aufzucht von *E. californica*

Zur Untersuchung des Einflusses von Auxin auf die Blattentwicklung von *E. californica* wurde der Auxintransporthemmer NPA (Naphthylphthalamsäure) verwendet. Von steril aufgezogenen acht Tage Keimlingen (2.3.1) wurden die Wurzeln mit einem Skalpell abgetrennt und das abgeschnittene Ende des Hypokotyls etwa einen halben Zentimeter tief in das Kulturmedium eingesetzt. Die Kultur der Pflanzen erfolgte auf mit 15 µM NPA supplementiertem B5-Medium (2.1.2.) in speziellen Kulturboxen (Magenta-Vessel G7-3, Sigma-Aldrich). Eine Kontrollgruppe wurde parallel auf B5-Medium kultiviert. Es wurden insgesamt 75 Pflanzen auf NPA-haltigem und 55 Pflanzen auf Kontrollmedium zu jeweils fünf Pflanzen pro Box bei einer Temperatur von 23 °C mit einer täglichen Beleuchtungsdauer von 15 h kultiviert. Die phänotypischen Veränderungen wurden fotografisch dokumentiert.

### 2.4.2 Analyse der Transkriptmengen von *EcFLO* und *EcSTM* durch sqRT-PCR

Zur Analyse der Transkriptmengen von *EcFLO* und *EcSTM* wurde aus den Sprossscheiteln extrahierte RNA verwendet. Für die RNA-Extraktion wurden die Sprossscheitel von jeweils fünf Pflanzen gleichen Phänotyps der auf NPA-haltigem Medium kultivierten Pflanzen bzw. von auf Kontrollmedium kultivierten Pflanzen vereint. Für die anschließende cDNA-Synthese (2.2.7) wurden pro Probe durchschnittlich 250 ng RNA eingesetzt. Die sqRT-PCR (2.2.8) wurde mit je 2 µl cDNA und den intronüberspannenden Primern EcL08F und EcL02R für *EcFLO* bzw. EchBF125 und EchBR518 für *EcSTM* (Tab.2.1) durchgeführt.

## 2.5 Virus induziertes Gen Silencing (VIGS)

Durch Virus induziertes Gen Silencing (VIGS) sollten *FLO*- und *KNOX*-Funktionsverlustmutanten von *E. californica* erzeugt werden. Virus induziertes Gen Silencing ist eine effektive Methode, um mit Hilfe viraler Vektoren gezielt Gene in einer Pflanze auszuschalten. Dazu wird das Genom eines Pflanzenvirus in das Ti-Plasmid von *Agrobacterium* integriert. Das zu untersuchende pflanzliche Gen wird in den viralen Teil des Vektors kloniert. Wird dieser Vektor anschließend durch Infektion einer Wundstelle oder Infiltration über Blätter in eine Pflanze eingeschleust, wird eine Abwehrreaktion der Pflanze gegen das Virus ausgelöst, in deren Verlauf das endogene pflanzliche Gen ebenfalls ausgeschaltet wird.

### 2.5.1 Vektoren

Tobacco Rattle Virus (TRV) ist ein ss(+)RNA Virus mit zweiteiligem Genom, dessen Komponenten RNA1 (GenBank AF406990) und RNA2 (GenBank AF406991) als cDNA in einen binären Vektor kloniert wurden und so mit Hilfe von *Agrobacterium* in Pflanzen eingebracht werden können. Die Vektoren wurden von S. Dinesh-Kumar (Yale University, New Haven, CT USA) zu Verfügung gestellt. Für die Verwendung von TRV mit *E. californica* wurden in die Multiple Cloning Site (MCS) der RNA2-Komponente (pTRV2) Fragmente verschiedener Gene aus *E. californica* zwischen die *Xba*I und *Sac*I Schnittstellen inseriert. Die RNA1 (pTRV1) des Virus trägt verschiedene Strukturgene, z. B. das für die Bewegung des Virus in der Pflanze verantwortliche Movement Protein, und wurde nicht verändert. Die Plasmide wurden in *A. tumefaciens* GV3101 transformiert (2.3.10). Ein *Agrobacterium* Stamm beinhaltet entweder die RNA1-Komponente (pTRV1) oder die RNA2-Komponente (pTRV2). Eine Übersicht über die konstruierten Plasmide geben Tabelle 2.2 und Abbildung 2.2.



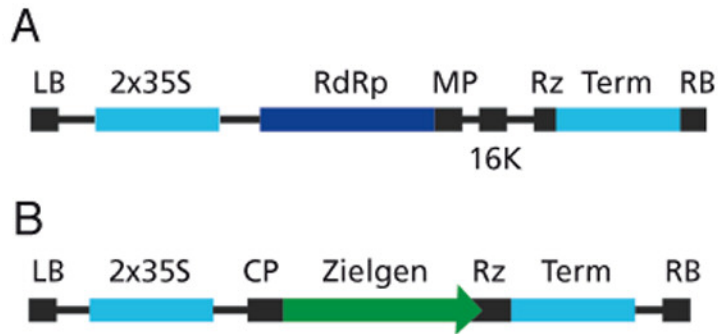


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der zwei genomischen Komponenten RNA1 (A) und RNA2 (B) von Tobacco Rattle Virus  
 CP: coat protein; LB und RB: left und right border des Ti-Plasmids; MP: movement protein; RdRp: RNA dependent RNA Polymerase; Rz: self-cleaving Ribozyme; Term: Terminator; 16K: 16 kDa cystein rich protein; 35S CaMV 35S: promoter; grüner Pfeil: Fragment des Zielgens, hier: *EcPDS*, *EcFLO* oder *EcKNOX*

## 2.5.2 Vektorkonstruktion

Es wurden Vektoren zum Silencing der Gene *EcPDS* (*Eschscholzia californica* *Phytoen-Desaturase*; s. 2.5.3.), *EcFLO*, *EcKNOX* und *EcSTM* (GROOT et al. 2005) konstruiert. Zur Konstruktion des Vektors pTRV-*EcPDS* wurde ein 546 bp langes Fragment des Gens *EcPDS* mit den Primern PDS-F2 und PDS-R3 isoliert und ein 407 bp langes Fragment daraus in den Vektor pTRV2 ligiert (Primer PDS-F1 und PDS-R1). Die Vektoren pTRV-*EcFLO*1 und pTRV-*EcFLO*2 enthalten ein 529 bp langes Fragment aus dem zweiten Exon (Primer EcL34F und EcL35R) bzw. ein 209 bp langes Fragment aus dem dritten Exon (Primer EcL36F und EcL37R) von *EcFLO*. Für den Vektor pTRV-*EcKNOX* wurde ein 389 bp langes Fragment aus der konservierten *KNOX*-Domäne gewählt (Primer EcKN14F und EcKN15R), während der Vektor pTRV-*EcSTM* ein 99 bp langes, für *EcSTM* spezifisches Fragment aus dem nicht konservierten Bereich zwischen der *KNOX*- und der *ELK*-Domäne enthält (Primer EcKN12F und EcKN13R).

## 2.5.3 Klonierung des Gens *Phytoen-Desaturase* aus *E. californica*

Zur Erstellung von Primern für die Klonierung eines Fragments des Gens *Eschscholzia californica* *Phytoen-Desaturase* (*EcPDS*) wurden Sequenzen von *PDS*-Homologen anderer Angiospermen (GenBank Accessionsnummern AB114665; AF049356; AJ571700; AJ616742; AJ621573; AY062039; AY099483; AY183118; AY484445; AY500378; AY593974; M64704) mit dem Programm MacClade 4 (MADDISON & MADDISON 2000) aligniert. Mit Hilfe dieses Alignments wurden die

Primer PDS-F2 und PDS-R3 entworfen und ein 546 bp Fragment des Gens aus cDNA von *E. californica* amplifiziert. Dieses wurde mit dem pGEM<sup>®</sup> T-Vector System II (Promega) nach den Angaben des Herstellers ligiert und in *E. coli* transformiert. Anschließend wurde das Plasmid mit den Primern SP6 und T7 sequenziert. Die Sequenz des Genfragments wurde bei GenBank unter der Accessionsnummer EF208023 hinterlegt.

#### **2.5.4. Aussaat und Anzucht von *E. californica***

Um die Pflanzen in ihrer Entwicklung zu synchronisieren, wurden die Samen zunächst für zwei Tage bei 4 °C in Wasser zum Quellen gebracht. Anschließend wurden je fünf Samen pro Topf (Ø 11 cm) in Erde (je 20 % Torf, Litauentorf, Kokosfaser, Kompost, Bims/Sand) ausgesät. Die Anzucht erfolgte im Klimakonstantraum bei einer Temperatur von 23 °C mit einer täglichen Beleuchtungsdauer von 16 h. Einige Tage nach der Keimung wurde die Anzahl der Keimlinge pro Topf auf einen reduziert. Die Pflanzen wurden ab einem Alter von vier Wochen zwei Mal wöchentlich mit 4 g/l Hakaphos spezial (Compo) gedüngt. Um einem Schädlingsbefall der Klimaräume vorzubeugen wurden die trockenen Samen vor der Aussaat für 24 Stunden -80 °C ausgesetzt und die Erde wurde autoklaviert.

#### **2.5.5 Infektion von *E. californica* mit pTRV-Vektoren**

Die Infektion von *E. californica* mit pTRV-Vektoren erfolgte nach Protokoll IV von Lu et al. (2003). Es wurden frische und durch PCR verifizierte Einzelkolonien benutzt. Die beiden genomischen Komponenten von TRV wurden zunächst getrennt kultiviert. Es wurden jeweils 10 ml LB Medium mit Antibiotika versetzt, mit einer Kolonie angeimpft und bei 28-30 °C über Nacht bis zur einer OD<sub>600</sub> von 1 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen für 20 min bei 3000 Upm zentrifugiert (Beckman J2-HS, JA-20 Rotor) und die Pellets in 10 ml steril filtrierter Infektionslösung (10 mM MgCl<sub>2</sub> mit 100 µM Acetosyringon und 1 mM MES, pH 5,6) resuspendiert. Anschließend wurden die Kulturen je einer RNA1-Komponente und einer RNA2-Komponente im Verhältnis 1:1 gemischt und für weitere zwei Stunden auf einem Kippschüttler kultiviert. Für die Infektion der Pflanzen wurden die Kulturen in Spritzen (20 ml) ohne Nadel überführt und diese für etwa 10 sec mit sanftem Druck gegen die Blattunterseite gepresst. Alternativ wurden die Pflanzen an Stängel oder Blatt mit

einem Skalpell verletzt und einige Tropfen der Suspension in die Schnittstelle geträufelt. Das Alter der Pflanzen zum Zeitpunkt der Infektion variierte in den verschiedenen Versuchen (Tab. 2.4). Zur Etablierung des Protokolls wurde der Vektor pTRV-EcPDS benutzt, der ein durch Silencing des Gens *Phytoen-Desaturase* hervorgerufenes Ausbleichen der Pflanzen bewirkt und so eine optische Kontrolle des Vorgangs ermöglicht. Weitere Infektionen wurden mit den Vektoren pTRV2, pTRV-EcFLO1, pTRV-EcFLO2, pTRV-STM und pTRV-KNOX durchgeführt.

### **2.5.6 Vergleichende Untersuchung des Einflusses einer Infektion mit pTRV-EcFLO und pTRV-EcKNOX auf die Blattentwicklung von *E. californica***

Der Einfluss von *EcFLO* und *EcKNOX* auf die Blattentwicklung von *E. californica* wurde in einem Infektionsexperiment sowohl morphologisch als auch molekularbiologisch im direkten Vergleich untersucht. Jeder Ansatz dieses Versuchs bestand aus 30 Pflanzen, die zu Beginn des Versuchs eine homogene morphologische Struktur aufwiesen. Alle Pflanzen hatten zum Zeitpunkt der Infektion vier Laubblätter, von denen das Älteste jeweils 3 cm lang war. Um zu überprüfen, wie viele Blattprimordien zu diesem Zeitpunkt bereits angelegt waren, wurden am Tag der Infektion zusätzlich vier Pflanzen für die REM Untersuchung der Sprossscheitel präpariert. Die Infektion der Pflanzen erfolgte mit den Vektoren pTRV-EcFLO1, pTRV-EcKNOX, sowie pTRV-EcPDS als Positivkontrolle und pTRV2 als Negativkontrolle. Als weitere Negativkontrolle dienten 30 nicht infizierte Pflanzen. In einem zusätzlichen Ansatz wurden 15 Pflanzen mit einer Suspension infiziert, die als RNA2 Komponente sowohl pTRV-EcFLO1 als auch pTRV-EcKNOX enthielt (pTRV-EcFLO+pTRV-EcKNOX). Die Entwicklung der Pflanzen wurde im Verlauf des Experiments fotografisch dokumentiert. Zur morphologischen Auswertung wurde die Anzahl der Fiedern von Blättern bestimmter Knoten gezählt (Blatt 5, 8, 11, 14, 17). Die entsprechenden jungen Blätter wurden mit Klebeschildchen markiert, um die Anzahl der Fiedern am adulten Blatt ermitteln zu können. Außerdem wurde die Gesamtzahl der Blätter pro Pflanze nach zwei, fünf und neun Wochen ermittelt, wobei das jüngste in die Zählung eingehende Blatt eine Mindestlänge von 1,5 cm aufwies. Die ermittelten Daten wurden statistisch ausgewertet (2.5.8). Des Weiteren wurden die Transkriptmengen der Gene *EcPDS*, *EcFLO* und *EcSTM* in mit den entsprechenden Vektoren infizierten Pflanzen untersucht.

### 2.5.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop (XL 30 ESEM, Philips) wurden die Proben zunächst in einer ansteigenden Alkoholreihe (70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % und 95 % Ethanol) entwässert und anschließend in 100 %-iges Aceton überführt. Die Proben verblieben in jeder Alkoholkonzentration für mindestens zwei Stunden. Das Aceton wurde nach zwei Stunden einmal gewechselt. Anschließend wurden die Proben im Critical Point Dryer (CDP030, BAL-TEC) getrocknet, auf Untersuchungstischchen für REM aufgebracht und mit Gold besputtert (SCD 005 Sputter Coater, BAL-TEC).

### 2.5.8 Statistische Auswertung der Blatt- und Fiederzahlen

Zur statistischen Auswertung der Blatt- und Fiederzahlen (Anhang Tab. 1; Anhang Tab. 2) wurde das Programm SPSS 15.0 (SPSS Inc.) verwendet. Da die Daten beider Datensätzen nicht normalverteilt waren, wurde als nichtparametrisches Testverfahren der Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

Tab. 2.4 : Übersicht über die durchgeführten VIGS-Experimente

Zielgen	Vektor	Versuchsnummer	Anzahl der Pflanzen	Alter der Pflanzen bei Infektion	
<i>PDS</i>	pTRV-PDS	1	16	3 Monate	
			15	2 Wochen	
		2	6	2 Wochen	
			4	4 Wochen	
		3	8	4 Monate	
			30	2 Wochen	
<i>FLO</i>	pTRV-FLO1	1	15	10 Tage	
			20	4 Wochen	
		3	30	2 Wochen	
			pTRV-FLO2	1	15
		pTRV-KNOX		1	20
			2	30	2 Wochen
<i>KNOX</i>	pTRV-STM	1		20	4 Wochen

### **2.5.9 Untersuchung der Transkriptmengen von *EcPDS*, *EcFLO* und *EcSTM* mittels sqRT-PCR**

#### ***EcPDS***

Für die für die Untersuchung der Transkriptmenge von *EcPDS* wurde aus den 18 Tage nach der Infektion präparierten Blättern RNA extrahiert. Für die cDNA Synthese wurden pro Probe  $360\pm 20$  ng RNA eingesetzt. Die sqRT-PCR (2.2.8) wurde mit je 1  $\mu$ l cDNA und mit den intronüberspannenden Primern PDS-F2 und PDS-R3 durchgeführt. Diese liegen außerhalb des in den Vektor klonierten Bereichs von *EcPDS*. Es wurden die Transkriptmengen von 13 mit pTRV-*EcPDS* infizierten und je drei mit pTRV2 infizierten bzw. nicht infizierten Pflanzen untersucht.

#### ***EcFLO* und *EcSTM***

Für die für die Untersuchung der Transkriptmenge von *EcFLO* wurden einen Monat nach der Infektion die Sprossspitze von je fünf Pflanzen der mit pTRV-*EcFLO*1 und der mit den beiden Vektoren pTRV-*EcFLO*1 und pTRV-KNOX infizierten Gruppe sowie von je vier Pflanzen der mit pTRV2 und der nicht infizierten Gruppe für eine RNA Extraktion präpariert. Für die cDNA Synthese wurden pro Probe  $155\pm 15$  ng RNA eingesetzt. Die sqRT-PCR (2.2.8) wurde mit je 2  $\mu$ l cDNA und den Primern *EcL08F* und *EcL02R* durchgeführt. Diese liegen außerhalb des in den Vektor klonierten Bereichs von *EcFLO*. Die Untersuchung von *EcSTM* wurde in Zusammenarbeit mit S. Meyer (MEYER 2006) durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Gewebekultur und *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Keimlingsexplantaten und unreifen Samen von *Eschscholzia californica***

##### **3.1.1 Keimlingsexplantate**

###### **3.1.1.1 Kalluskultur und somatische Embryogenese**

Durch die Kultur von Keimlingsexplantaten auf Callus Induction Medium (10,7  $\mu\text{M}$  NAA/0,4  $\mu\text{M}$  BAP) wurde die Bildung von Kallusgewebe induziert (Abb. 3.1 A-C). Das aus den verschiedenen Explantaten entstandene Kallusgewebe wies unterschiedliche Beschaffenheiten auf, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Das aus Hypokotylexplantaten hervorgegangene Kallusgewebe war in der Regel hart und kompakt und nur schwer zu zerteilen. Aus Keimblattexplantaten hervorgegangener Kallus bestand dagegen aus lockerem, leicht zerfallendem Gewebe, das von PARK & FACCHINI (2000a) als embryogen beschrieben wird. Die auf Embryo Induction Medium (5,3  $\mu\text{M}$  NAA/2,2  $\mu\text{M}$  BAP) übertragenen Kalli wuchsen weiter, bildeten aber weder bei Kultur in Dunkelheit noch bei Beleuchtung somatische Embryonen.

###### **3.1.1.2 Screening der Hormonkonzentrationen**

Keimlingsexplantate bildeten auf hormonfreiem Medium Wurzeln an den Wundflächen. Kallus wurde auf diesem Medium nicht entwickelt. Auch der Einsatz von 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  NAA ohne BAP führte an einigen Explantaten zur Wurzelbildung, während sich an anderen Explantaten auf den gleichen Medien Kallus entwickelte. Alle anderen Konzentrationen führten zur Kallusbildung, wobei hier allerdings besonders lockerer, potentiell embryogener Kallus unter Einwirkung von 100  $\mu\text{M}$  NAA ohne BAP entstand. Die Kultur von Kallusgewebe, das zuvor auf Medium mit 10,7  $\mu\text{M}$  NAA und 0,4  $\mu\text{M}$  BAP induziert worden war, führte auf hormonfreiem Medium zur Wurzelbildung. Bei Kultur auf BAP-haltigen Medien in Kombination mit den verschiedenen NAA-Konzentrationen war dagegen weiteres Kalluswachstum zu beobachten, das unter Einfluss hoher Konzentrationen beider

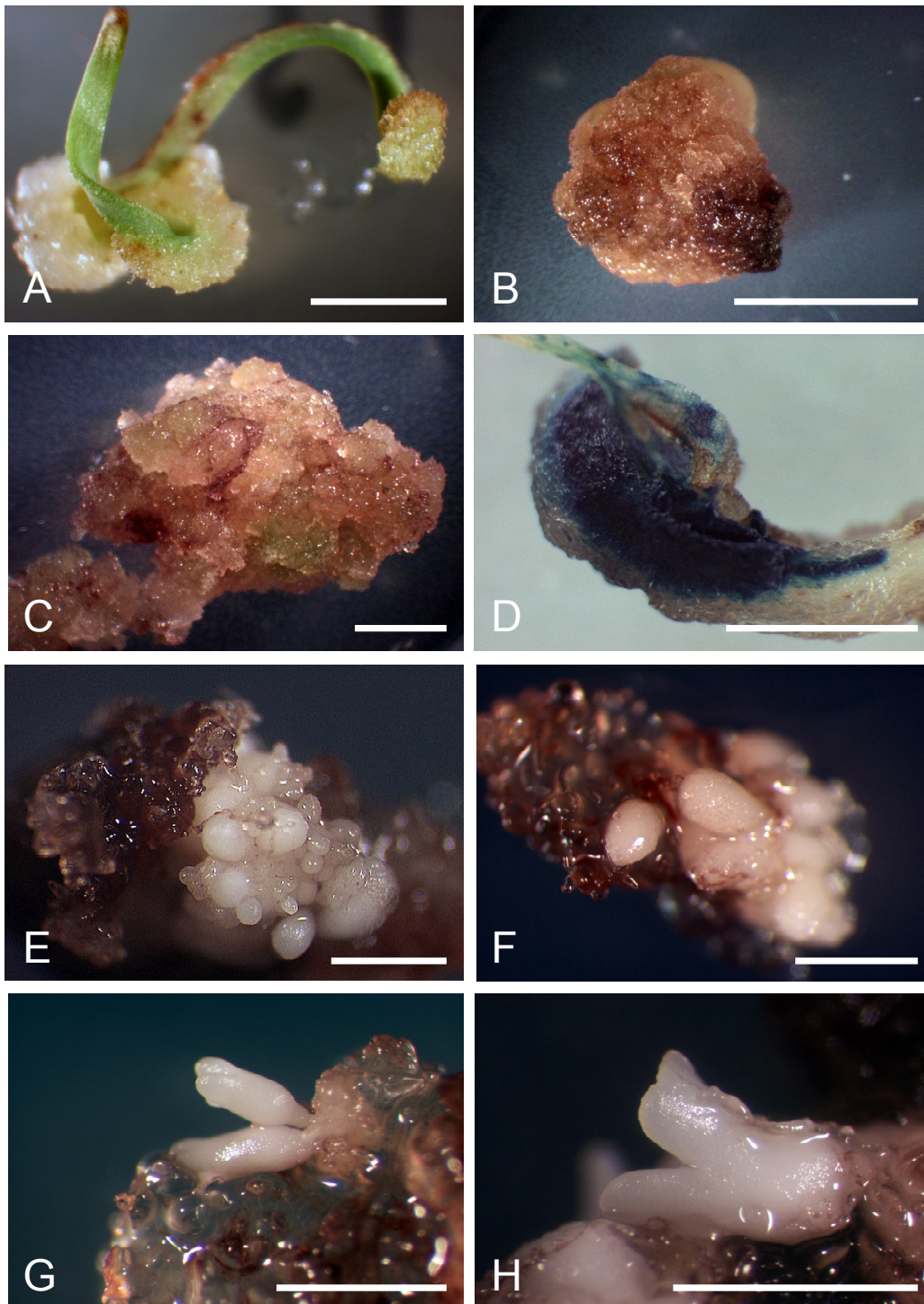


Abb. 3.1: Kallus und somatische Embryonen aus Keimlingsexplantaten von *E. californica*. A) Kallus an Keimblatt nach zweiwöchiger Kultur auf CIM B-C) Kallus nach sechswöchiger Kultur auf CIM B) kompakter Typ C) leicht zerfallender Typ D) *GUS*-Expression in transgenem Kallus (blau) E-F) somatische Embryonen nach Kultur des Kallus auf EIM. Maßstab: 5 mm; CIM: Callus Induction Medium (NAA 10,7  $\mu$ M; BAP 0,4  $\mu$ M) , EIM: Embryo Induction Medium (NAA 5,3  $\mu$ M; BAP 2,2  $\mu$ M)

Hormone (100  $\mu\text{M}$  NAA mit 5  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  BAP) jedoch eingestellt wurde. Somatische Embryonen entwickelten sich nicht.

### **3.1.1.3 Einfluss der Temperatur auf die Embryogenesefähigkeit von Kallusgewebe**

Innerhalb zweiwöchiger Kultur auf Embryo Induction Medium (5,3  $\mu\text{M}$  NAA/2,2  $\mu\text{M}$  BAP) bei einer Temperatur von 26 °C wurden somatische Embryonen an Kallus des lockeren, leicht zerfallenden Typs, der zuvor auf Callus Induction Medium (10,7  $\mu\text{M}$  NAA/0,4  $\mu\text{M}$  BAP) induziert worden war, entwickelt. Auf verschiedenen Kalli waren zahlreiche somatische Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu erkennen (Abb. 3.1). In weiteren Experimenten ließ sich trotz Anwendung der hier zur Embryogenese führenden Bedingungen, dieser Schritt nicht reproduzieren.

### **3.1.1.4 Kombiniertes Hormon-Temperatur-Screening**

Alle Hormonkonzentrationen führten zur Kallusbildung. Dabei war auffällig, dass besonders lockeres, potentiell embryogenes Gewebe sowohl unter Einfluss von 0,4  $\mu\text{M}$  BAP/1  $\mu\text{M}$  NAA als auch auf BAP freiem Medium mit 10,7  $\mu\text{M}$  NAA erzeugt wurde. Wurzelbildung konnte dagegen an auf hormonfreiem Medium kultiviertem Kallus nicht wie im vorangegangenen Screening der Hormonkonzentrationen beobachtet werden. Weiterhin konnte kein auf den Temperatureinfluss während der Kallusinduktion zurückzuführender Unterschied in der Qualität oder Quantität des Kallusgewebes festgestellt werden. Die Übertragung der Kalli auf Embryo Induction Medium führte in keinem der Fälle zur Embryobildung.

### **3.1.1.5 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Keimlingsexplantaten**

Drei Wochen nach der Transformation von *E. californica* mit dem Vektor pBI121 konnte im entstandenen Kallusgewebe  $\beta$ -Glucuronidase Aktivität histochemisch nachgewiesen werden. 50% der untersuchten Proben (n=10) zeigten eine deutliche Blaufärbung im Kallusgewebe, die aber auf kleine Bereiche beschränkt war (Abb. 3.1 D). In wildtypischem Gewebe (Kallus oder Blätter) wurde dagegen keine  $\beta$ -Glucuronidase Aktivität nachgewiesen. Die Kultivierung der mit dem Vektor pBI-EcFLO transformierten Gewebestücke wurde analog der oben beschriebenen



Hormon- und Temperatur-Screenings durchgeführt. Dabei entstand zunächst bei allen Hormonkonzentrationen Kallusgewebe, das allerdings eine deutliche Braunfärbung aufwies und im weiteren Verlauf der Kultur nach insgesamt etwa sechs Wochen abstarb.

### **3.1.2 Unreife Samen**

#### **3.1.2.1 Kalluskultur und somatische Embryogenese**

Die Entstehung von Kallusgewebe und somatischen Embryonen aus unreifen Samen war nach siebenwöchiger Kultur auf verschiedenen Medien (Tab. 2.3) zu beobachten. Während die Kallusbildung unabhängig von Hormonkonzentration und Reifegrad der Samen einsetzte, war die Entstehung somatischer Embryonen auf bestimmte Proben beschränkt. Die Samen der Gruppe S (Kapseln 1-2 cm lang) bildeten bei keiner der Hormonkonzentrationen somatische Embryonen. Die Samen der Gruppe M (Kapseln 2,5-3,5 cm lang) keimten auf hormonfreiem Medium aus, wobei an der Sprossbasis häufig Kallus mit somatischen Embryonen entstand. Die anderen Hormonkonzentrationen führten dagegen zur Bildung von Kallus ohne die Entwicklung von somatischen Embryonen. Die Samen der Gruppe L (Kapseln 4-5,5 cm lang) bildeten dagegen sowohl auf hormonfreiem Medium als auch unter Einfluss der vier verschiedenen Hormonkonzentrationen somatische Embryonen (Abb. 3.2).

#### **3.1.2.2 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation unreifer Samen**

An mit *A. tumefaciens* transformierten Samen war im Gegensatz zu untransformierten Samen (s.o.) in zahlreichen Experimenten keine weitere Entwicklung feststellbar. In einem Transformationsexperiment entwickelten transformierte Samen jedoch nach einer Kulturdauer von über zwei Monaten unabhängig von Reifegrad, Hormonkonzentration und Dauer der Kokultur mit *A. tumefaciens* Kallus und somatische Embryonen, die zur Regeneration verwendet wurden.

Es wurden insgesamt 94 somatische Embryonen im Keimblattstadium von den Kalli abgetrennt und auf hormonfreies Medium zur Regeneration übertragen (Tab. 3.1). 56,4 % der zur Regeneration eingesetzten Embryonen (n=94) stammten aus

Samen der Gruppe L, 20,2 % aus Samen der Gruppe M und 23,4 % aus Samen der Gruppe S. Da auf Grund der langen Kulturdauer von über zwei Monaten davon ausgegangen werden musste, dass das Kallusgewebe erst nach Abklingen des Selektionsdruckes durch das Antibiotikum entstanden und somit nicht transgen ist, wurde, um dennoch eine Regeneration der Pflanzen zu ermöglichen, dem Medium ausschließlich Timentin zur Unterdrückung weiteren Wachstums der Agrobacterien beigesetzt.

Tab 3.1.: Herkunft der zur Regeneration eingesetzten somatischen Embryonen (Hormonkonzentrationen s. Tab.2.3).

	<b>Gruppe S</b>	<b>Gruppe M</b>	<b>Gruppe L</b>
<b>Konzentration 1</b>	-	12	9
<b>Konzentration 2</b>	15	5	26
<b>Konzentration 3</b>	4	-	4
<b>Konzentration 4</b>	3	2	2
<b>hormonfreies Medium</b>	-	-	12
<b>Anzahl Embryonen pro Gruppe</b>	22 (23,4%)	19 (20,2%)	53 (56,4%)

Nach der Trennung vom Kallusgewebe stellten alle Embryonen, außer denen der Gruppen M und L, die auf dem Medium der Konzentration 1 induziert worden waren, die Entwicklung sofort oder nach kurzer Zeit ein. Von diesen 21 regenerierenden Embryonen entwickelten 15 Embryonen im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung Blätter aber keine Wurzeln. Ein Embryo der Gruppe L entwickelte erneut Kallus und weitere somatische Embryonen, von denen einige ergrünten (Abb. 3.2 E). Fünf der 21 regenerierenden Embryonen der Gruppen M und L entwickelten Wurzeln und regenerierten zu phänotypisch normalen Pflanzen. Vier dieser Embryonen entfallen auf Gruppe M, einer auf Gruppe L. Die fünf bewurzelten jungen Pflanzen wurden zur weiteren Kultur in Erde übertragen. Vier Pflanzen starben innerhalb zwei Wochen nach der Übertragung ab: Eine Pflanze der Gruppe M entwickelte sich im Laufe der folgenden Wochen weiter und kam etwa drei Monate nach dem Austopfen zur Blüte (Abb. 3.2 F-I). Der mittels PCR an zehn der 21 ergrünenden Embryonen durchgeführte Test auf den Einbau des aus der T-DNA übertragenen Inserts war in allen Proben negativ.

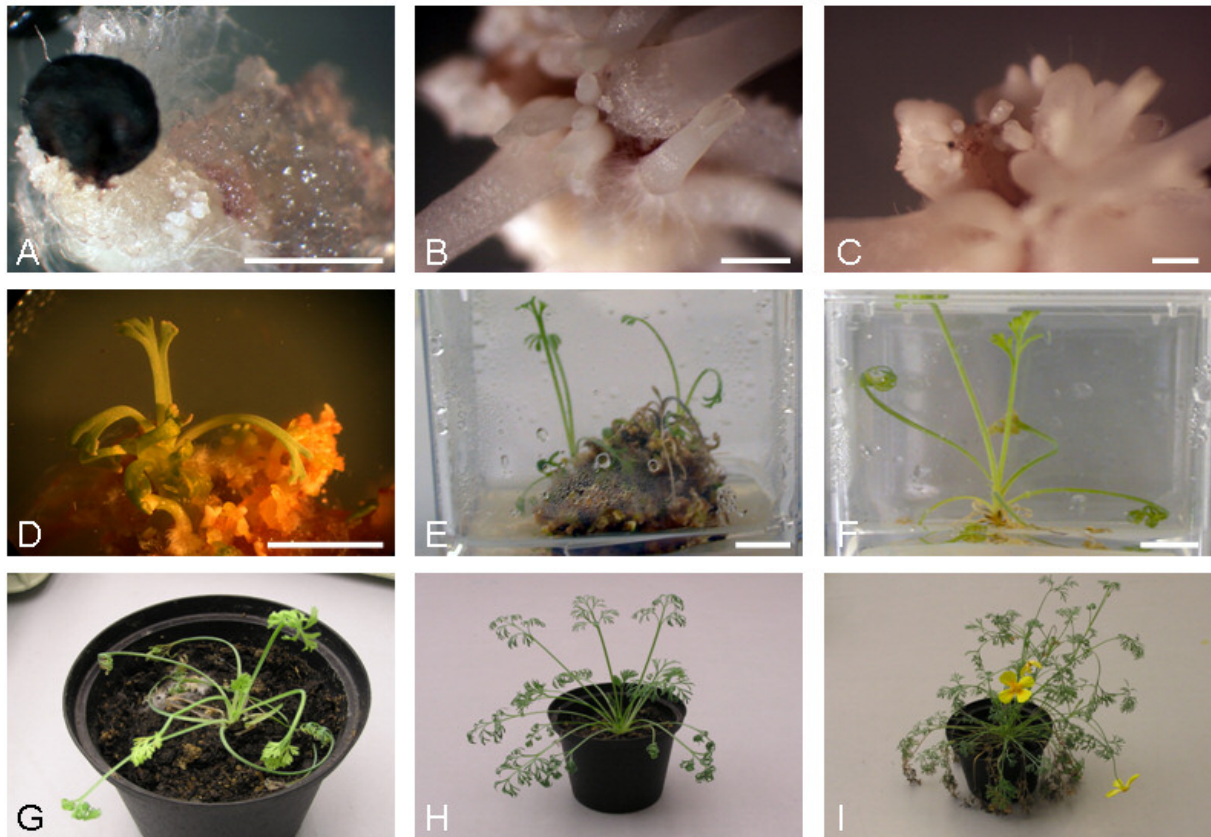


Abb. 3.2: Entstehung und Regeneration somatischer Embryonen aus unreifen Samen von *E. californica*. A) Kallus B-C) somatische Embryonen in versch. Stadien D) aus somatischem Embryo regenerierender Spross auf Kallus E) sekundärer Kallus mit weiteren somatischen Embryonen und teils regenerierenden Sprossen F-I) regenerierende, bewurzelte Pflanze in steriler Agarkultur (F) und vier, acht und 14 Wochen nach dem Austopfen. Maßstab: (A-C) 1 mm; (D-F) 1 cm.

## **3.2 Der Einfluss von Auxin auf die Blattentwicklung von *Eschscholzia californica***

### **3.2.1 Phänotypische Veränderungen bei Hemmung des Auxintransports**

Im Rahmen dieses Experiments wurde *Eschscholzia californica* unter Zusatz von 15  $\mu\text{M}$  NPA kultiviert. Die Verwendung von höheren Konzentrationen hatte vergleichbare phänotypische Auswirkungen, während die Letalität der Pflanzen jedoch erhöht wurde (MELZER 2005). Im vorliegenden Experiment führte die Kultur von *E. californica* unter Einfluss von 15  $\mu\text{M}$  NPA zum Absterben von 25% der Pflanzen. An den verbleibenden Pflanzen (n=56) wurden im Vergleich zu den Kontrollpflanzen phänotypische Veränderungen der Blätter in Form von Reduktionen der Fiederung und Verwachsungen hervorgerufen. Eine Reduktion des Fiederungsgrades war an den Blättern aller Pflanzen in unterschiedlicher Ausprägung feststellbar und führte in extremen Fällen zur Bildung ganzrandiger Blätter (Abb. 3.3). An 77% der Pflanzen war zusätzlich das Wachstum röhrenförmig verwachsener Blätter zu beobachten. Diese wiesen am distalen Ende eine Öffnung auf, deren Rand ungeteilt oder gelappt bzw. gefiedert war (Abb. 3.3). Der basale Teil der Röhre umschloss das folgende Blatt entweder völlig oder es entstand ein Spalt, durch den dieses hindurch wuchs. An 14% der Pflanzen entstanden Verbänderungen (Fasziationen) der Blätter. Diese traten jeweils an einem Blatt pro Pflanze auf und erstreckten sich bei jeweils der Hälfte der betroffenen Pflanzen über den distalen Teil des Blattes in Kombination mit einer röhrenförmigen Verwachsung des basalen Teils bzw. über das ganze Blatt, das in sich verdreht oder schraubig um den Sprossscheitel herum wuchs und auf das keine weiteren Blätter folgten. Auf der Oberfläche dieser Blätter konnte eine mit der Ausbildung von Lappungen, Buchtungen oder Fiederungen übereinstimmende Änderung der Leitbündelanordnung festgestellt werden. In den ganzrandigen Teilen verliefen die Leitbündel parallel wie im Blattstiel, während in Bereichen mit Ausbuchtungen des Randes ein gabeliger Verlauf wie in der Blattspreite sichtbar wurde.

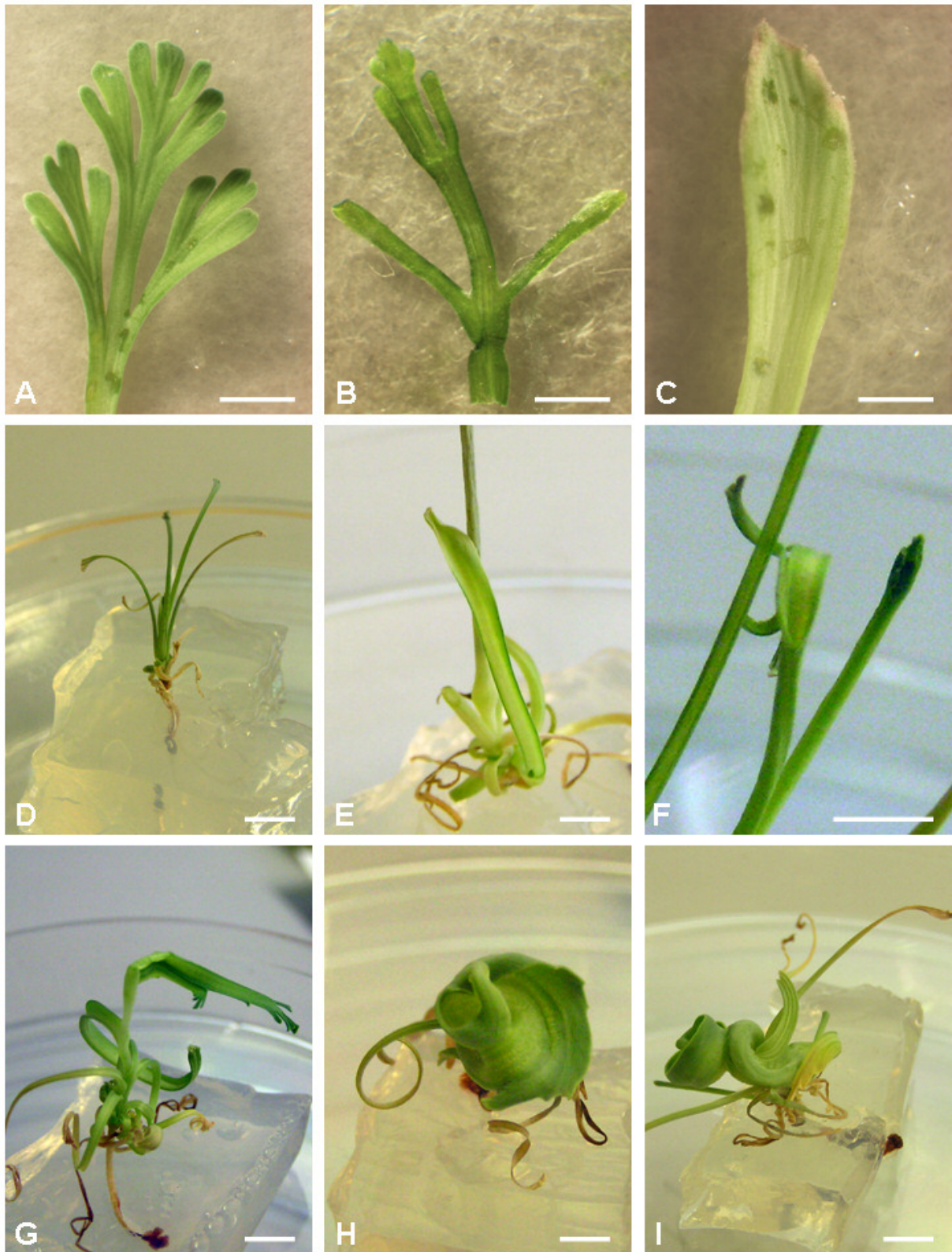


Abb. 3.3: Veränderung der Blattmorphologie von *E. californica* unter Einfluss von NPA. A) Blatt einer unbehandelten Pflanze. Reduktion der Blattfiederung (B-D), Entwicklung röhrenförmiger (E-F) und (G-I) fascierter Blätter unter Einfluss von NPA. Maßstab: (A-C) 2 mm; (D-I) 5 mm; Bilder (A-C): B. Melzer.

### 3.2.2 Untersuchung der Expression von *EcFLO* und *EcSTM* bei Hemmung des Auxintransports

Zur Untersuchung der Expression der Gene *EcFLO* und *EcSTM* (Abb. 3.4) konnten neun RNA-Proben aus Sprossscheiteln der mit NPA behandelten Pflanzen und sieben RNA-Proben aus Sprossscheiteln von unbehandelten Kontrollpflanzen gewonnen werden. Die PCR-Transkripte des Referenzgens waren nach 20 PCR-Zyklen schwach, nach 22 PCR-Zyklen in allen Proben deutlich nachweisbar. Leichte Unterschiede in den Bandenintensitäten waren erkennbar. Die Transkripte von *EcFLO* waren nach 30 PCR-Zyklen in allen Kontrollproben und in drei von neun Proben der mit NPA behandelten Pflanzen (Proben 4-6) schwach erkennbar. Nach 37 PCR-Zyklen waren Amplifikate in allen Proben deutlich nachweisbar. Die Amplifikate der Kontrollproben (Proben 10-16) wiesen eine einheitliche Intensität auf. Während die Intensität der Banden der NPA-Proben 4-6 damit vergleichbar war, zeigten sechs der neun NPA-Proben (Proben 1-3 u. 7-9) eine Abschwächung der Bandenintensitäten, die auch nach 40 PCR-Zyklen noch erkennbar war. Transkripte von *EcSTM* waren nach 22 PCR-Zyklen in den Proben 1 und 7 nicht, in allen weiteren Proben schwach und nach 24 PCR-Zyklen in allen Proben deutlich detektierbar. Die Bandenintensitäten einzelner Proben wiesen leichte Unterschiede auf, die auch nach 26 PCR-Zyklen noch erkennbar waren. Im Vergleich zu den anderen Proben sind die Bandenintensitäten der NPA-Proben 1 und 7-9 sowie der Kontrollproben 10-12 und 15 etwas schwächer.

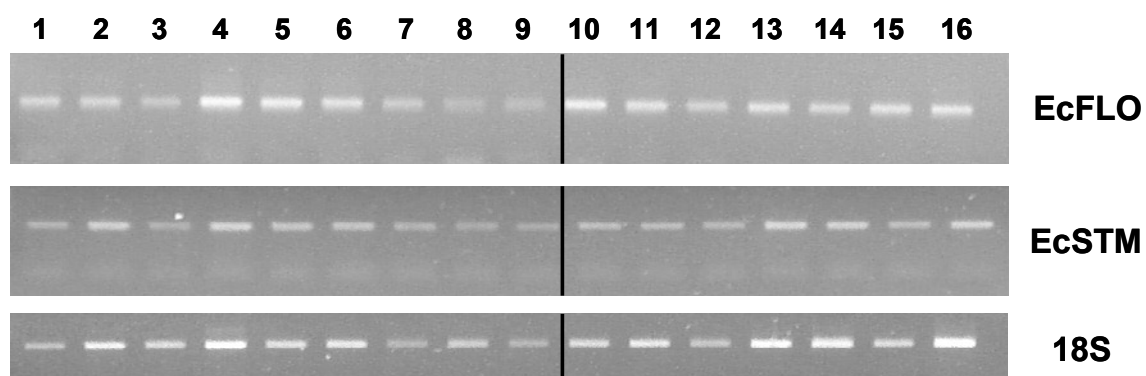


Abb. 3.4: Analyse der Transkriptmengen von *EcFLO* und *EcSTM* in Sprossscheiteln von mit NPA behandelten Pflanzen (1-9) und unbehandelten Pflanzen (10-16). Oben: *EcFLO*, 40 PCR-Zyklen; Mitte: *EcSTM* 26 PCR-Zyklen; Unten: Referenz 18S rRNA, 24 PCR-Zyklen.

### **3.3 Virus Induziertes Gen Silencing (VIGS) in *Eschscholzia californica***

#### **3.3.1 VIGS von *EcPDS***

##### **3.3.1.1 Phänotypen**

Ziel dieses Versuchs war die Etablierung der Methode des Virus Induzierten Gen Silencing in *Eschscholzia californica*. Es wurden drei unabhängige Infektionen von *E. californica* mit pTRV-EcPDS durchgeführt. Im ersten Experiment wurde die Infektionsmethode variiert (Infiltration mit und ohne Verletzung). Da dies jedoch keine Auswirkungen auf Intensität oder Dauer der Symptome hatte, wurden in allen folgenden Experimenten Blätter ausschließlich ohne vorherige Verletzung mit pTRV2 und dessen Derivaten infiziert. Die Infektion mit pTRV2 beeinträchtigte die Entwicklung der Pflanzen im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen nicht. Die typischen Symptome einer Infektion mit Tobacco Rattle Virus, wie Nekrosen und Chlorosen an Blättern und Stängeln, blieben aus. Lediglich an den zur Infektion benutzten Blättern traten als Reaktion auf das Eindringen des Erregers Nekrosen an den Spitzen der Blattfiedern auf (Hypersensitive Response).

In allen Experimenten zeigten die mit pTRV-EcPDS infizierten Pflanzen Entfärbungen der Blätter. An den zur Kontrolle mit dem Vektor pTRV2 infizierten Pflanzen sowie nicht infizierten Pflanzen wurden keine vergleichbaren Symptome festgestellt. Im ersten Experiment zeigten 81% (n=16) der drei Monate alten und 100% (n=15) der zwei Wochen alten mit pTRV-EcPDS infizierten Pflanzen Entfärbungen der Blätter als Symptome. Zwei der zwei Wochen alten Pflanzen dieses Experiments starben, nachdem alle Blätter oberhalb der Infektionsstelle vollständig entfärbt waren. In den folgenden Experimenten war die Letalitätsrate unabhängig vom Grad der auftretenden Symptome gleich null und es wurde eine Infektionsrate von je 100% erreicht.

Die Ausbreitung der Infektion verlief von der Infektionsstelle in Richtung des Sprossscheitels, wobei die Symptome immer oberhalb der Infektionsstelle auftraten. Bei im Alter von einem Monat oder mehreren Monaten infizierten Pflanzen wurden Entfärbungen der Blätter 12-14 Tage nach der Infektion sichtbar, bei zum Zeitpunkt

der Infektion zwei Wochen alten Pflanzen bereits acht Tage nach der Infektion. Die Entfärbung der Blätter begann entlang der Leitbündel und breitete sich innerhalb der Blätter vom Mittelnerv zum Blattrand hin aus. Einzelne Blätter entfärbten dabei unabhängig vom Alter der Pflanze und der Infektionsmethode entweder vollständig oder nur partiell (Abb. 3.5). Partiiell entfärbte Blätter ergrünerten nach einer Zeitspanne von einigen Wochen wieder, während vollständig entfärbte Blätter abstarben. Das Abklingen der Symptome begann bei zum Zeitpunkt der Infektion zwei Wochen alten Pflanzen nach etwa drei Wochen, bei älteren Pflanzen blieben die Symptome über einen Zeitraum von etwa sechs Wochen bestehen. Nach dem Abklingen der Symptome regenerierten die Pflanzen vollständig, einige entwickelten jedoch erneut Symptome (s. u.). Entfärbungen beschränkten sich in allen Experimenten auf Blätter und Stängel. Blütenorgane und Früchte waren nicht betroffen (Abb. 3.6).

Das zeitliche Auftreten und die Intensität der Symptome variierten von Pflanze zu Pflanze und wurden in Experiment 3 an 30 zum Zeitpunkt der Infektion zwei Wochen alten Pflanzen detailliert untersucht. Eine Woche nach der Infektion zeigten 93% (n=30) der Pflanzen deutliche Entfärbungen, die bei 61% dieser Pflanzen an einem Blatt und bei 39% bereits an zwei Blättern sichtbar waren. Zwei Wochen nach der Infektion waren an 100% der Pflanzen Entfärbungen an Blättern sichtbar, die sich an einzelnen Pflanzen vom fünften bis zum zwölften Blatt erstreckten, wobei die Anzahl der Entfärbungen aufweisenden Blätter zwischen zwei und sieben pro Pflanze variierte. An den beiden in der ersten Woche nach der Infektion symptomfreien Pflanzen erstreckten sich die Entfärbungen jeweils auf das achte, neunte und zehnte Blatt. Die ersten Symptome traten an je 13 Pflanzen (43%) an Blatt 5 bzw. Blatt 6 und an je zwei Pflanzen (7%) an Blatt 7 bzw. Blatt 8 auf.

---

Abb. 3.5 (S. 46): VIGS von *PDS* in *E. californica*. A-B) mit pTRV2 infizierte Pflanzen; C-I) mit pTRV-EcPDS infizierte Pflanzen mit Entfärbungen an Blättern und Stängeln C-E) partiell entfärbte Blätter und Stängel (Pfeile in E); F-I) vollständig entfärbte Blätter; J) mit pTRV2 infizierte Pflanze, blühend; K-L) mit pTRV-EcPDS infizierte Pflanzen, blühend, Entfärbungen an vegetativen Teilen (Pfeile in L).





---

Drei Wochen nach der Infektion begann die Regeneration der Pflanzen. An 80% der Pflanzen begannen zuvor entfärbte Blätter wieder zu ergrünen. Nur noch sechs Pflanzen (20%) zeigten weiterhin starke Symptome, die innerhalb der folgenden zwei bis vier Wochen ebenfalls abklangen, was zum Ergrünen der Blätter führte. An insgesamt sieben der 30 Pflanzen (23%) traten im weiteren Verlauf des Experiments nach der vollständigen Regeneration der Pflanzen erneut Entfärbungen einiger neu angelegter Blätter auf (Abb. 3.6). Der Zeitpunkt des Auftretens sowie die Intensität der wiederkehrenden Symptome variierten stark zwischen den betroffenen Pflanzen. Die Entfärbungen der Blätter waren wie beim ersten Auftreten der Symptome partiell oder vollständig und erstreckten sich über ein bis vier Blätter pro Pflanze. An einer Pflanze wurden die erneuten Entfärbungen fünf Wochen nach dem vollständigen Abklingen der ersten Symptome sichtbar und blieben über eine Dauer von sechs Wochen bestehen. Eine weitere Pflanze zeigte acht Wochen nach Abklingen der ersten Symptome erneute Entfärbungen, die ebenfalls über fünf Wochen bestehen blieben. Die wiederholt auftretenden Symptome der anderen fünf Pflanzen blieben lediglich für einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen sichtbar. Der Zeitpunkt des Auftretens lag drei, sechs, acht, 13 bzw. 14 Wochen nach dem Abklingen der ersten Symptome.

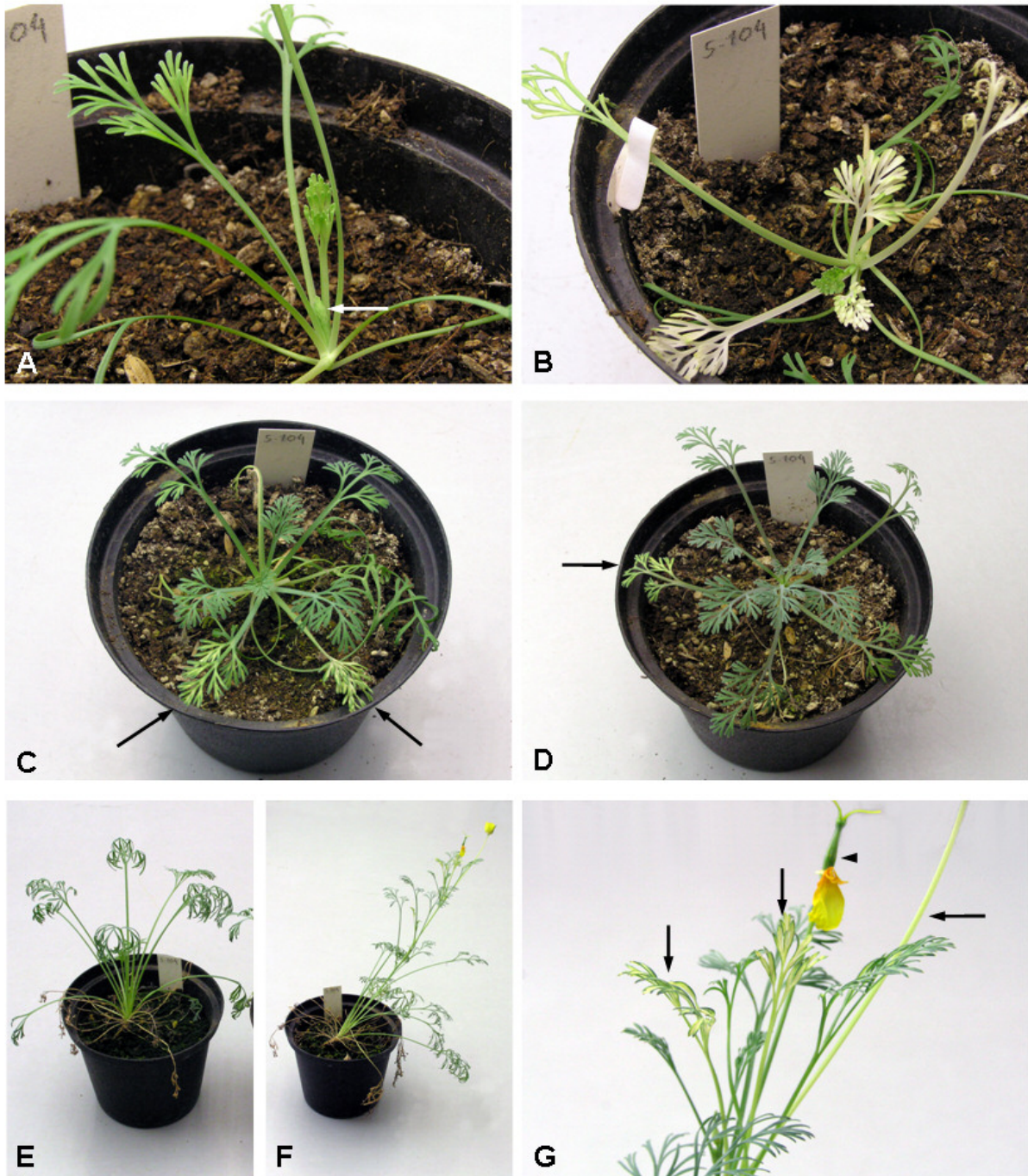


Abb. 3.6: Zeitlicher Verlauf des VIGS von *EcPDS*. A) erste Entfärbungen eine Woche nach der Infektion mit dem Vektor pTRV-*EcPDS* an den jüngsten Blättern (Pfeil) B) vollständige Entfärbung mehrerer Blätter zwei Wochen nach der Infektion C-D) Regeneration der entfärbten Blätter und Entwicklung neuer grüner Blätter vier bzw. sechs Wochen nach der Infektion E) vollständig regenerierte Pflanze 20 Wochen nach der Infektion F-G) erneutes Auftreten von Entfärbungen an Stängel und Blättern (Pfeile) 20 Wochen nach der Infektion, Blüte und Frucht (Pfeilspitze) weisen keine Entfärbungen auf.

### 3.3.1.2 Analyse der Transkriptmenge von *EcPDS*

Die Transkriptmengen von *EcPDS* in mit pTRV-*EcPDS* infizierten Pflanzen wurde mittels sqRT-PCR im Vergleich zu nicht infizierten und mit pTRV2 infizierten Pflanzen untersucht. Es wurde cDNA von 13 mit pTRV-*EcPDS* infizierten, drei mit pTRV2 infizierten und drei nicht infizierten Pflanzen verwendet (Abb. 3.7). Bei elf der 13 mit pTRV-*PDS* infizierten Pflanzen ist eine deutliche Reduktion der Transkriptmenge nach 40 PCR-Zyklen erkennbar. Lediglich die Proben 5 und 13 weisen eine den Proben der nicht infizierten bzw. mit pTRV2 infizierten Pflanzen vergleichbare Intensität der *EcPDS*-Amplifikate auf. Die zur Normalisierung der Proben amplifizierten 18S-Transkripte wiesen in der exponentiellen Phase der PCR (26 Zyklen) lediglich minimale Unterschiede in der Bandenintensität auf, was den Einsatz gleichmäßiger cDNA-Mengen in den einzelnen Proben anzeigt. Da zur RNA Extraktion das jeweils sechste Blatt der Pflanzen präpariert wurde, die Ausbreitung der Symptome in den einzelnen Pflanzen aber unterschiedlich schnell verlief (3.3.1.1), ergaben sich Unterschiede im Grad der Entfärbung der einzelnen für die RNA Extraktion verwendeten Blätter. Die Proben 1-6 stammen aus vollständig entfärbtem, die Proben 7-13 aus partiell entfärbtem Blattgewebe.

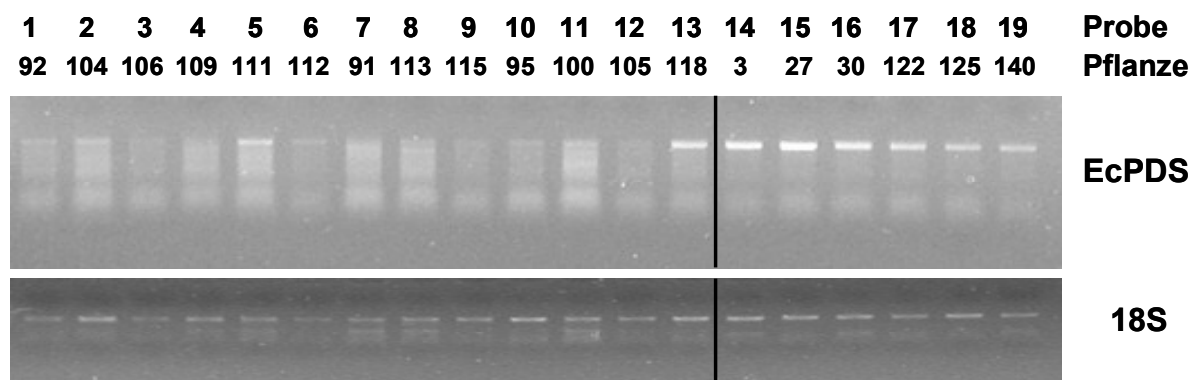


Abb. 3.7: Analyse der *EcPDS*-Transkriptmenge bei VIGS von *EcPDS*. Proben aus Blattgewebe von mit pTRV-*EcPDS* infizierten (1-13), mit pTRV2 infizierten (14-16) und nicht infizierten (17-19) Pflanzen. Proben 1-6 aus vollständig entfärbtem, Proben 7-13 aus partiell entfärbtem Blattgewebe. Oben: *EcPDS*, 40 PCR-Zyklen; Unten: Referenz 18S rRNA, 26 PCR-Zyklen.

### 3.3.2 VIGS von *EcFLO* und *EcKNOX*

#### 3.3.2.1 Phänotypen

Die Infektionen von *E. californica* mit den Vektoren pTRV-EcFLO1, pTRV-EcFLO2, pTRV-EcSTM und pTRV-EcKNOX (Tab. 2.4) verursachten keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Da jedoch die durch das Silencing hervorgerufenen phänotypischen Effekte sehr gering sein können, wurden in einem weiteren Versuch die Auswirkungen der Infektion auf *EcFLO* und *EcSTM* als Zielgene vergleichend untersucht.

Die REM-Untersuchung der vier am Tag der Infektion präparierten nicht infizierten Pflanzen (2.5.6; 2.5.7) zeigte, dass diese nur leichte Unterschiede im Stand ihrer Entwicklung aufwiesen. Alle Pflanzen hatten vier voll entwickelte Blätter. Die fünften und sechsten Blätter hatten eine durchschnittliche Länge von 1-2 bzw. 0,5-1 mm. An allen untersuchten Pflanzen war das Primordium des siebten Blattes mit einer Länge von 124  $\mu\text{m}$  bis 470  $\mu\text{m}$  ausgebildet. An einer Pflanze war als jüngstes Blatt das achte mit einer Länge von 190  $\mu\text{m}$  entwickelt. An zwei weiteren Pflanzen waren die Primordien der neunten Blätter bereits mit einer Größe von 114  $\mu\text{m}$  bzw. 130  $\mu\text{m}$  erkennbar.

Durch die Infektion mit pTRV-EcFLO1 und pTRV-EcKNOX bzw. beiden Vektoren gleichzeitig (pTRV-EcFLO1+pTRV-EcKNOX) wurden im Vergleich zu den Kontrollpflanzen keine wesentlichen Unterschiede in der Morphologie der Pflanzen hervorgerufen. Die Anzahl der Blätter pro Pflanze unterlag ab der zweiten Versuchswoche leichten Schwankungen sowohl innerhalb der als auch zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Abb. 3.8). In der statistischen Auswertung wurden die Daten der fünf Versuchsgruppen jeweils paarweise miteinander verglichen. Signifikante Unterschiede wurden dabei lediglich für drei der Versuchsgruppen im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen ermittelt (Tab. 3.2). Die mit pTRV2 infizierten Pflanzen zeigten nur in der neunten Versuchswoche einen signifikanten Unterschied ( $p=0,009$ ) zu nicht infizierten Pflanzen. Die mit pTRV-EcFLO1 infizierten Pflanzen zeigten dagegen im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen bereits signifikante Unterschiede ab der zweiten Woche nach der Infektion (Woche2  $p=0,028$ ; Woche5  $p=0,001$ ; Woche9  $p=0,005$ ). Die Blattzahlen der mit pTRV-EcKNOX infizierten Pflanzen waren in der fünften ( $p=0,0011$ ) und neunten Woche ( $p=0,001$ ) zu den nicht

infizierten Pflanzen signifikant verschieden. Die an den mit pTRV-EcFLO1+pTRV-EcKNOX infizierten Pflanzen auftretenden Schwankungen waren dagegen im Vergleich zu keiner der anderen Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich.

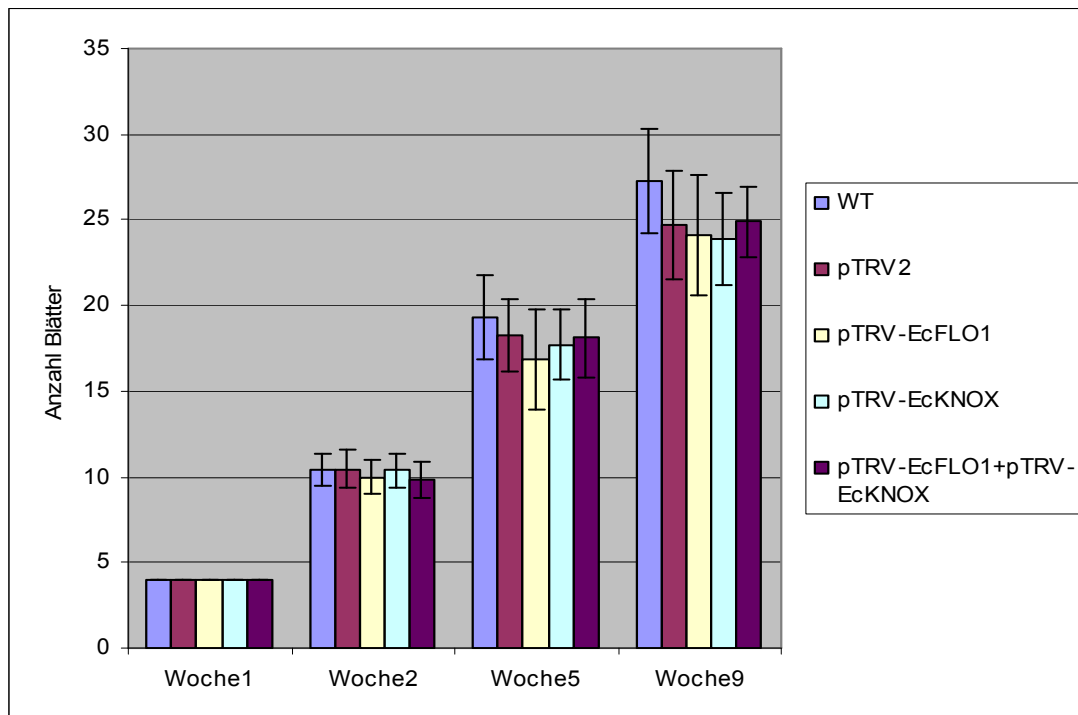


Abb. 3.8: Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Blätter pro Pflanze an nicht infizierten und mit Derivaten von pTRV2 infizierten Pflanzen.

Tab. 3.2: Ergebnisse des Mann-Whitney-U Tests für die Anzahl der Blätter pro Pflanze, A) Signifikante Unterschiede: \* schwach signifikant ( $p \leq 0,05$ ); \*\* signifikant ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\* hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ); Wo: Woche nach der Infektion B) Anzahl der in die Berechnung eingehenden Individuen.

<b>A</b>	pTRV2	EcFLO	EcKN	EcFLO+KN	
WT	-	Wo2 *(0,024)	-	-	
	-	Wo5 *** (0,001)	Wo5 ** (0,011)	-	
	Wo9 ** (0,009)	Wo9 ** (0,005)	Wo9 *** (0,001)	-	
				-	
<b>B</b>	WT	pTRV2	EcFLO1	EcKN	EcFLO+KN
Woche1	30	30	30	30	15
Woche2	30	30	30	30	15
Woche5	27	30	30	24	14
Woche9	23	24	25	24	8

Die Blätter der mit pTRV-EcFLO1 und pTRV-EcKNOX bzw. beiden Vektoren gleichzeitig (pTRV-EcFLO1+pTRV-EcKNOX) infizierten Pflanzen ließen keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen erkennen. Insgesamt war an Pflanzen aller Versuchsgruppen ein Anstieg der Fiederzahl pro Blatt von einem Knoten zum nächst jüngeren zu verzeichnen. Allerdings wurde bei einigen Individuen der mit pTRV-EcKNOX infizierten Pflanzen ein Trend zur Verringerung der Anzahl der Fiedern pro Blatt erkennbar. In der statistischen Auswertung wurden die Daten der fünf Versuchsgruppen jeweils paarweise miteinander verglichen. Signifikanzen wurden nur für die Daten der mit pTRV-EcKNOX infizierten Pflanzen ermittelt. Diese wiesen an Blatt 11 im Vergleich zu mit pTRV2 infizierten Pflanzen ( $p=0,026$ ), an Blatt 14 im Vergleich zu mit pTRV2 infizierten ( $p=0,015$ ) und nicht infizierten Pflanzen ( $p=0,016$ ) und an Blatt 17 im Vergleich zu nicht infizierten ( $p=0,026$ ), mit pTRV2 infizierten ( $p=0,009$ ) und mit pTRV-EcFLO infizierten ( $p=0,001$ ) Pflanzen signifikante Unterschiede im Grad der Fiederung auf (Tab. 3.3). Alle anderen auftretenden Schwankungen in der Anzahl der Fiedern pro Blatt (Abb. 3.9) ergaben keine signifikanten Unterschiede. Zwölf der 25 mit pTRV-EcFLO1 infizierten und vier der zehn mit pTRV-EcFLO1+pTRV-EcKNOX infizierten, nicht für eine RNA-Extraktion präparierten Pflanzen kamen im Verlauf des Experiments zur Blüte. Eine Veränderung der Blütenmorphologie zeigte sich im Vergleich zu Kontrollpflanzen nicht.

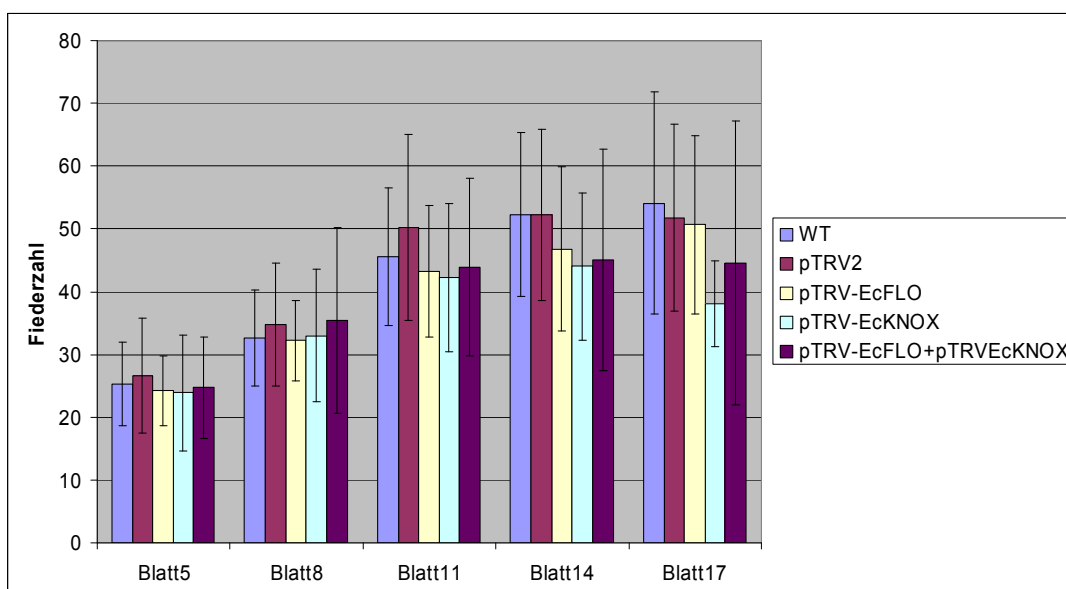


Abb. 3.9: Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Fiedern pro Blatt an den Blättern 5, 8, 11, 14, 17 an nicht infizierten und an mit Derivaten von pTRV2 infizierten Pflanzen

Tab. 3.3: Ergebnisse des Mann-Whitney-U Tests der Anzahl der Fiedern pro Blatt A) Signifikante Unterschiede: \* schwach signifikant ( $p \leq 0,05$ ); \*\* signifikant ( $p \leq 0,01$ ); \*\*\* hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ); BL: Blatt; B) Anzahl der in die Berechnung eingehenden Blätter.

<b>A</b>		WT	pTRV2	EcFLO	EcFLO+KN	
EcKN	-		BL11 * (0,026)	-	-	
	BL14 ** (0,016)		BL14 ** (0,015)	-	-	
	BL17 * (0,026)		BL17 *** (0,009)	BL17 *** (0,001)	-	
					-	
<b>B</b>		WT	pTRV2	EcFLO1	EcKN	EcFLO+KN
Blatt 8		27	30	29	29	15
Blatt 11		28	29	30	28	15
Blatt 14		23	27	30	27	15
Blatt17		12	17	21	19	5

### 3.3.2.2 Analyse der Transkriptmengen von *EcFLO* und *EcSTM*

Veränderungen der Transkriptmengen von *EcFLO* und *EcSTM* wurden mittels sqRT-PCR untersucht. Die Transkriptmengen von *EcFLO* wurden in mit pTRV-EcFLO1 bzw. mit pTRV-EcFLO1+pTRV-EcSTM infizierten Pflanzen im Vergleich zu mit pTRV2 infizierten und nicht infizierten Pflanzen vergleichend untersucht (Abb. 3.10). Die zur Normalisierung amplifizierte 18S-Transkripte wiesen in der exponentiellen Phase der PCR (25 Zyklen) eine relativ gleichmäßige Bandenintensität auf. *EcFLO*-Transkripte waren nach 37 PCR-Zyklen in 13 der 17 Proben und nach 40 PCR-Zyklen in allen Proben nachweisbar, wobei die Intensitäten der Banden der Proben 3, 4 und 17 im Vergleich zu den Banden anderen Proben deutlich schwächer waren. Die Banden der mit pTRV-EcFLO1 (5-9) infizierten Pflanzen zeigten allerdings ebenso wie vier der Proben der mit pTRV-EcFLO1+pTRV-EcSTM (13-17) infizierten Pflanzen keine Abschwächung der Intensität gegenüber denen der Proben der Kontrollpflanzen. Probe 17 (pTRV-EcFLO1+pTRV-EcSTM) wies eine im Vergleich zu den anderen Proben schwächere Intensität sowohl der 18S-Transkripte als auch der *EcFLO*-Transkripte auf.



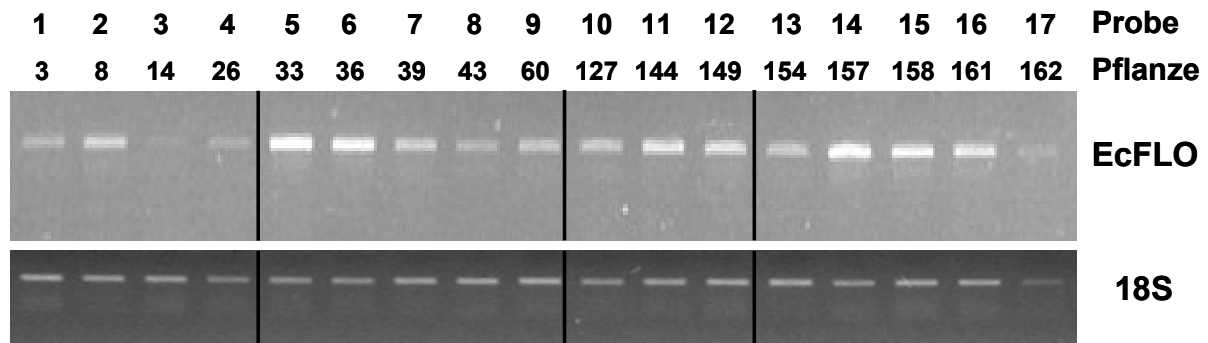


Abb. 3.10: Analyse der *EcFLO*-Transkriptmenge bei VIGS von *EcFLO*. Proben aus Apikalmeristemen von mit dem Vektor pTRV2 infizierten (1-4), mit pTRV-*EcFLO*1 infizierten (5-9), nicht infiziert (10-12) und mit pTRV-*EcFLO*1+pTRV-*EcKNOX* infizierten Pflanzen (13-17). Oben: *EcFLO*, 40 PCR-Zyklen; Unten: Referenz 18S rRNA, 25 PCR-Zyklen.

Die Transkriptmengen von *EcSTM* wurden in mit pTRV-*EcKNOX* infizierten Pflanzen und mit dem Vektor pTRV2 infizierten bzw. nicht infizierten Pflanzen untersucht (Abb. 3.11). Die 18S-Transkripte wiesen in der exponentiellen Phase der PCR nach 25 Zyklen eine relativ einheitliche Bandenintensität auf. Die Proben der mit pTRV-*EcKNOX* infizierten Pflanzen zeigten dagegen im Vergleich zu den Proben der Kontrollpflanzen starke Unterschiede in den Bandenintensitäten. Während die Banden der Proben 9, 11, 14, 15, 16 und 19 den Proben der Kontrollpflanzen (Proben 1-6) vergleichbare Intensitäten aufwiesen, waren die Amplifikate der Proben 7, 8, 10, 12, 13, 17, 18 und 20 äußerst schwach bzw. nicht nachweisbar.

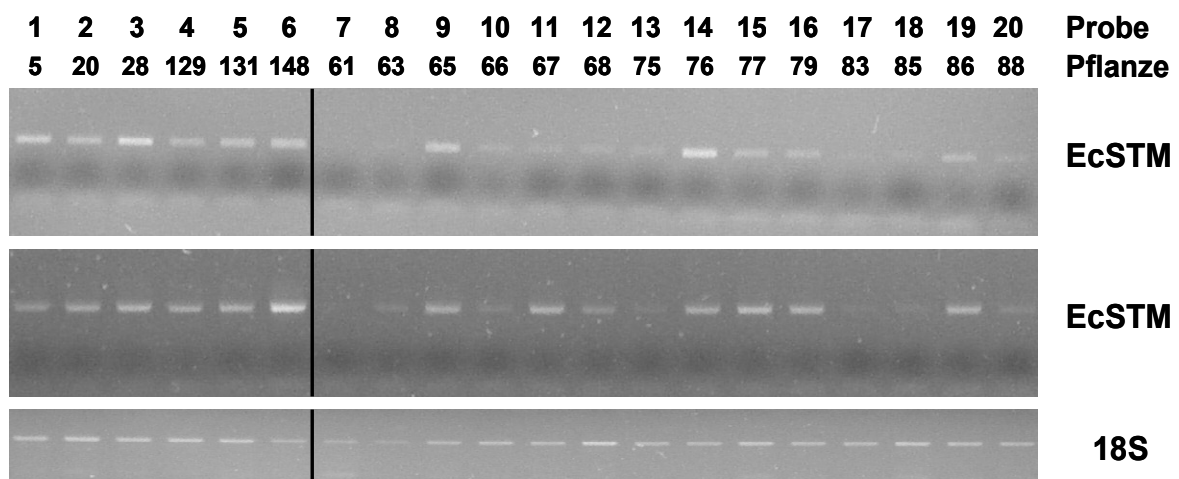


Abb. 3.11: Analyse der *EcSTM*-Transkriptmenge bei VIGS von *EcSTM*. Proben aus Apikalmeristemen von mit dem Vektor pTRV2 infizierten (1-3), nicht infizierten (4-6) und mit pTRV-*EcKNOX* infizierten Pflanzen (7-20). Oben: *EcSTM*, unverdünntes PCR-Template, 25 PCR-Zyklen; Mitte: *EcSTM*, 1:5 verdünntes PCR-Template, 30 PCR-Zyklen; Unten: Referenz 18S rRNA, 25 PCR-Zyklen (nach Meyer 2006).

## 4. Diskussion

### 4.1 Gewebekultur und *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Eschscholzia californica*

#### 4.1.1 Somatische Embryogenese aus Keimlingsexplantaten

Aufgrund ihrer Verwendung als Zierpflanzen einerseits und ihrer medizinisch und pharmazeutisch bedeutsamen Alkaloide andererseits existieren für verschiedene Papaveraceae s.l. Protokolle zur *in vitro* Vermehrung (*Papaver somniferum* L.: NESSLER 1982; *Meconopsis simplicifolia* G.Don: SULAIMAN et al. 1991; *Corydalis yanhusuo* W.T.Wang: SAGARE et al. 2000; *Chelidonium majus* L.: VINTERHALTER & VINTERHALTER 2002). Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation beschränkte sich bis zur Veröffentlichung des Protokolls von PARK & FACCHINI (2000a) allerdings auf die Erzeugung von transgenen Suspensions- oder Kalluskulturen zur Untersuchung der Alkaloidbiosynthese, ohne jedoch transgene Pflanzen zu regenerieren (YOSHIMATSU & SHIMOMURA 1992; WILLIAMS & ELLIS 1993; BELNY et al. 1997; PARK & FACCHINI 2000b). Somit ist *Eschscholzia californica* die erste Art der Familie, für die die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation mit anschließender Regeneration adulter transgener Pflanzen über Kalluskultur und somatische Embryogenese beschrieben wurde (PARK & FACCHINI 2000a). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente dieses Protokoll als Grundlage für die Gewebekultur und Transformation von *E. californica*.

Das Potential eines Gewebes somatische Embryonen zu entwickeln hängt von verschiedenen Faktoren ab und wird durch die gewählten Kulturbedingungen maßgeblich beeinflusst. So können neben der histologischen Herkunft des verwendeten Gewebes unter anderem die Art und Konzentration der zugeführten Hormone, die Temperatur während der Kultur sowie die Zusammensetzung des Mediums in Hinblick auf z. B. die Art der Kohlenstoffquelle und den pH-Wert eine Rolle spielen. PARK & FACCHINI (1999; 2000a; 2001) kamen zu dem Ergebnis, dass die Kombination von NAA (1-Naphthyllessigsäure) mit BAP (6-Benzylaminopurin) in den auch in dieser Arbeit eingangs angewendeten Konzentrationen (2.3.2) sowie die Verwendung von Saccharose als Kohlenstoffquelle die optimalen Bedingungen zur

---

Induktion der somatische Embryogenese bietet und die höchste Anzahl somatischer Embryonen liefert.

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten zur Etablierung des Gewebekultursystems war es auffällig, dass unter Verwendung verschiedener Hormonkonzentrationen lockerer Kallus aus Keimlingsexplantaten erzeugt werden konnte, der nach PARK & FACCHINI (2000a) embryogen ist, der Stimulus zur Embryogenese jedoch jeweils fehlte. Auch die Annahme, dass die Temperatur der ausschlaggebende Faktor sei, bestätigte sich nicht. Die Entstehung embryogenen Kallus kann weiterhin sowohl von der Art des Ausgangsgewebes abhängen als auch der genotypischen Kontrolle unterliegen und auf bestimmte Arten einer Gattung oder sogar auf bestimmte Sorten einer Art beschränkt sein (GIROUX & PAULS 1997; CARIMI et al. 1999; SEABROOK & DOUGLASS 2001).

In *Papaver somniferum* gelang es, sowohl aus Hypokotyl- als auch aus Keimblattexplantaten somatische Embryonen zu induzieren, über die Effektivität der unterschiedlichen Gewebe existieren jedoch gegensätzliche Angaben (KASSEM & JACQUIN 2001; CHITTY et al. 2003). Zusätzlich existieren in unterschiedlichen Linien von *P. somniferum* teils gravierende Unterschiede in der Anzahl der entstehenden somatischen Embryonen (CHITTY et al. 2003). Die Tatsache, dass heller, lockerer und leicht zerfallender Kallus, der von PARK & FACCHINI (2000a) als embryogen beschrieben wurde und auch in dieser Arbeit einmalig zur Entstehung somatischer Embryonen angeregt werden konnte, aus den Explantaten der Keimblätter und nicht der Hypokotyle entstand, ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass in *E. californica* einzelne Gewebe eine unterschiedliche Embryogenesefähigkeit aufweisen. Für eine genotypische Kontrolle des Embryogenesepotentials einzelner Sorten von *E. californica* finden sich in der Literatur keine Hinweise. Da aber in der vorliegenden Arbeit kein zuverlässiges Protokoll für die somatische Embryogenese aus Keimlingsexplantaten etabliert werden konnte, während in der vorangegangenen Arbeit von PARK & FACCHINI (2000a) anscheinend keine diesbezüglichen Schwierigkeiten bestanden, muss die Möglichkeit der sortenabhängigen Embryogenesefähigkeit für *E. californica* überprüft werden.

Die Effektivität der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation wird ebenfalls von verschiedenen Faktoren, u. a. dem Alter und Typ der Explantate, der Dauer der

Kokultur der Explantate mit *Agrobacterium*, der Konzentration Hormone im Kulturmedium oder dem gewählten *Agrobacterium*-Stamm beeinflusst. Weder das Alter noch der Typ der Explantate (Keimblatt, Hypokotyl) scheinen die Transformation von *E. californica* zu beeinflussen (LEE & PEDERSEN 2001), allerdings erreichten PARK & FACCHINI (2001) unter Verwendung eines anderen *Agrobacterium*-Stammes bei gleicher Dauer der Kokultur eine um 50% höhere Transformationsrate. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Reportergens  $\beta$ -Glucuronidase (*GUS*) die erfolgreiche Transformation von Keimlingsexplantaten nachgewiesen werden (3.1.1.5). Die Transformation mit dem Vektor pBI-EcFLO, durch die *EcFLO*-überexprimierende Pflanzen erzeugt werden sollten, führte ebenfalls zu Kalluswachstum. Das Kallusgewebe war durch eine dunkle Färbung gekennzeichnet, die auch für Kalluskulturen von *P. somniferum* charakteristisch ist (CHITTY et al. 2003). Im Gegensatz zu Kulturen von *P. somniferum* kam es aber nicht zur Entstehung sekundären embryogenen und transgenen Kallusgewebes von heller Färbung, sondern zum Absterben der Kulturen.

Wie der histochemische Nachweis zeigte, war die  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität auf relativ kleine Bereiche des Kallus beschränkt (Abb. 3.1) und von nicht gefärbtem und somit nicht transgenem Gewebe umgeben. Das Wachstum nicht transgenen Kallusgewebes unter selektiven Bedingungen kann dadurch ermöglicht werden, dass die das Transgen exprimierenden Zellen in einem gewissen Radius eine nichtselektive Umgebung schaffen (LEE & PEDERSEN 2001; CERVERA et al. 1998) Um dieses Problem zu erkennen und zu umgehen, könnte ein Reportergen wie z. B. *GFP* (*Green Fluorescent Protein*) eingesetzt werden, dessen Expression im Gegensatz zur der von *GUS in planta* untersucht werden kann. Auf diese Weise können transgene Zellcluster erkannt und gegebenenfalls zur weiteren Kultur von nicht transgenem Gewebe getrennt werden. Ein weiteres Problem kann eine nur teilweise erfolgte Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom sein. Die Übertragung der T-DNA erfolgt von der rechten (RB) zur linken (LB) Bordersequenz. Ist das Markergen für die Selektion nahe der RB lokalisiert, kann es beim vorzeitigen Abbruch der Übertragung vorkommen, dass allein das Markergen integriert und exprimiert wird. Aus diesem Grund sollte für weitere Transformationsexperimente ein Vektor verwendet werden, bei dem das zu untersuchende Gen an der rechten und das Markergen an der linken Bordersequenz lokalisiert ist. Des Weiteren kann die

Transformationsrate eventuell durch Verwendung eines anderen, virulenteren Agrobacterien-Stammes oder durch die Zugabe bestimmter, die Reaktivität von Agrobacterien erhöhender Substanzen wie Acetosyringon gesteigert werden (GELVIN 2003).

#### 4.1.2 Somatische Embryogenese aus unreifen Samen

Die Benutzung anderer Gewebe als das der Keimblätter und Hypokotyle für die Kalluskultur und somatische Embryogenese ist innerhalb der Papaveraceae für *E. californica* und *Chelidonium majus* bereits erprobt (KAVATHEKAR & GANAPATHY 1973; KIM et al. 1999; PARK & FACCHINI 1999). Während in *Ch. majus* aus dem Kallus unreifer Samen hervorgegangene somatische Embryonen regenerierten (KIM et al. 1999), konnte in *E. californica* aus plazentalem Gewebe zwar erfolgreich embryogener Kallus induziert werden, die Regeneration der somatischen Embryonen war allerdings nicht möglich (KAVATHEKAR & GANAPATHY 1973). Aus diesem Grund verwendeten PARK & FACCHINI (1999) in ihrem Protokoll zunächst reife Samen. Diese bildeten unter Zugabe von Hormonen Kallus und somatische Embryonen, die problemlos und mit hoher Effizienz regenerierten. Aufgrund der harten Samenschale, die von Agrobacterien nicht durchdrungen werden kann, waren diese zur Transformation allerdings nicht geeignet. Aufgrund der anhaltenden Schwierigkeiten bezüglich der somatischen Embryogenese aus Keimlingsexplantaten wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Etablierung eines Protokolls, das die Verwendung unreifer Samen vorsieht, begonnen. Da bei diesen die Samenschale noch weich ist, sollte es möglich sein, das Gewebe für das Eindringen der Agrobacterien zu verletzen.

Die Verwendung unreifer Samen zur Kallusproduktion und Induktion somatischer Embryonen erwies sich als sehr effektiv. Im Vergleich der verwendeten Reifegrade erwiesen sich Samen aus Kapseln der Gruppen M und L (Länge 2,5-3,5 cm bzw. 4,0-5,5 cm) als am besten geeignet. Die Unterschiede in der Embryogenesefähigkeit sehr junger, aus Kapseln mit einer Länge von 1-2 cm stammende Samen (Gruppe S), die in den einzelnen Versuchen festgestellt wurden (3.1.2), sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass zur Klassifizierung des Reifegrades aus praktischen Gründen die Längenmessung der Kapseln und nicht die Feststellung des Bestäubungszeitpunktes diene. Dadurch sind vor allem in den

Grenzbereichen der gewählten Längenintervalle Überlappungen der Reifegrade bedingt. Weiterhin erhöht die Zugabe von Auxin und Cytokinin die Anzahl der gebildeten somatischen Embryonen gegenüber hormonfreiem Medium. Ein Zusammenhang scheint außerdem zwischen der zur Induktion der somatischen Embryogenese verwendeten Hormonkonzentration und der Regenerationsfähigkeit der somatischen Embryonen zu bestehen, da ausschließlich die auf Medium mit der Konzentration 1 zur Regeneration veranlasst werden konnten. Diese Hormonkonzentration wurden auch von PARK & FACCHINI (1999) als die effektivste zur Induktion somatischer Embryonen beschrieben, aber ein Zusammenhang zwischen der Hormonkonzentration und anschließender Regenerationsfähigkeit der Embryonen wird dort nicht beschrieben.

Weitere Probleme bei der Regeneration der Embryonen stellten die nur an wenigen Pflanzen einsetzende Wurzelbildung und die Entwicklung sekundären Kallusgewebes dar. Durch die erneute Entwicklung von Kallusgewebe und sekundären Embryonen wurde die Regeneration des primären Embryos unmöglich. Beide Probleme wurden bereits beschrieben (KAVATHEKAR & GANAPATHY 1973). Während in der vorliegenden Arbeit 23,8% der regenerierenden Embryonen (n=21) Wurzeln entwickelten, und die Entstehung von sekundärem Kallusgewebe an nur einer Pflanze beobachtet wurde, konnten KAVATHEKAR & GANAPATHY (1973) aus planzentalem Gewebe induzierte Embryonen gar nicht regenerieren, da sämtliche Embryonen anstelle von Wurzeln sekundären Kallus und weitere Embryonen entwickelten. Diese Probleme konnten schließlich durch Kühlung der Embryonen auf 6 °C und die Zugabe von BAP oder GA<sub>3</sub> zum Kulturmedium zumindest in je 16% der Fälle unterbunden und die Induktion der Primärwurzel veranlasst werden (KAVATHEKAR et al. 1977). PARK & FACCHINI (1999) gelang dagegen die Regeneration von 70% der aus reifen Samen und 32% der aus transformiertem Keimlingsgewebe induzierten somatischen Embryonen (PARK & FACCHINI 2000a) durch die weitere Kultur auf hormonfreiem Medium. Die Rate der regenerierenden somatischen Embryonen konnte durch Zugabe von Cytokinin (BAP oder Kinetin) oder Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>) in bestimmten Konzentrationen weiter erhöht und das Wachstum der Wurzeln gleichzeitig beschleunigt werden, wobei der Einsatz von 0,05 mg/l BAP das beste Resultat zeigte (PARK & FACCHINI 1999). Der Einsatz von Hormonen während der Regenerationsphase wurde in das Transformationsprotokoll

allerdings nicht einbezogen (PARK & FACCHINI 2000a). Da sowohl die Kältebehandlung als auch die Zugabe von Cytokinin bzw. Gibberellinsäure einen fördernden Effekt auf die Regenerationsfähigkeit der aus verschiedenen Geweben hervorgegangen somatischen Embryonen hatte, sollten diese Schritte bei weiter bestehender niedriger Regenerationsrate auch für das in der vorliegenden Arbeit angewendete Protokoll in weiteren Versuchen getestet werden.

Für das Wachstum von laut PCR-Nachweis nicht transgenem Kallusgewebe und Embryonen auf Selektionsmedium können verschiedene Ursachen vorliegen. Einerseits kann, wie bereits erläutert, die ausschließliche Integration der Antibiotikaresistenz verantwortlich sein, andererseits lag hier aufgrund des sehr spät einsetzenden Kalluswachstums die Vermutung nahe, dass der Selektionsdruck im Kulturmedium bereits abgeklungen und so das Wachstum wildtypischen Gewebes möglich war. Dies setzt voraus, dass die Samenschale zumindest eines Teils der Samen nicht ausreichend stark verletzt worden war, um ein Eindringen der Agrobacterien oder die Aufnahme des Antibiotikums zu ermöglichen.

Da sich die Induktion somatischer Embryonen aus dem Kallusgewebe unreifer Samen als sehr effektiv erwies, ist die Etablierung eines zuverlässigen Transformationsprotokolls für dieses Gewebe erstrebenswert. Neben der Erprobung der bereits erwähnten, die Transformation beeinflussenden Faktoren, ist es hier zunächst besonders wichtig das Gewebe für Agrobacterien zugänglich zu machen und die Verletzung der einzelnen Samen zu gewährleisten. Eine weitere Möglichkeit zur Transformation dieses hoch embryogenen Gewebes besteht in der Etablierung einer Suspensionskultur aus dem Kallus der Samen in Anlehnung an ein bereits existierendes Protokoll (PARK & FACCHINI 2001).

Da das aus Samen hervorgegangene Kallusgewebe im Gegensatz zum Keimlingsgewebe von Pflanzen der gleichen Sorte sehr embryogen ist, muss davon ausgegangen werden, dass die Embryogenesefähigkeit in *E. californica* sowohl sorten- als auch gewebeabhängig ist. Weitere Versuche sollten unter Einbeziehung verschiedener Sorten und ebenfalls verschiedener Gewebe durchgeführt werden, um die optimalen Bedingungen für die erfolgreiche Transformation und somatische Embryogenese finden zu können.

## 4.2 Der Einfluss von Auxin auf die Blattentwicklung von *Eschscholzia californica*

### 4.2.1 Der Einfluss von Auxin auf Blattpositionierung und -morphologie

In den vorliegenden Untersuchungen entstanden unter Einfluss des Auxintransporthemmers NPA (1-Naphthylphthalamsäure) in *E. californica* Aberrationen des Sprosses und der Blätter, die sich durch eine veränderte Blattstellung, das Wachstum zahlreicher Seitentriebe und vor allem durch die Fusion von Blättern und die Reduktion der Blatffiederung äußerten (3.2.1). Diese Ergebnisse spiegeln bekannte Phänomene wider, die durch Störungen des Auxinflusses in Pflanzen hervorgerufen werden. So haben z. B. *PINFORMED1*-Funktionsverlustmutanten von *A. thaliana* abnormale Blätter und Infloreszenzachsen mit deformierten Blüten oder Infloreszenzachsen, die keine Blüten entwickeln und nadelförmig sind. Die Blätter haben eine vom Wildtyp abweichende Nervatur, sind breiter als wildtypische Blätter und häufig fusioniert. Auch die Stellung der Blätter an der Infloreszenzachse ist im Vergleich zum Wildtyp verändert und es treten Fasziationen der Infloreszenzachsen auf (OKADA et al. 1991; GÄLWEILER et al. 1998). In diesen Pflanzen ist der polare Transport von Auxin gegenüber dem Wildtyp stark vermindert (OKADA et al. 1991). Dies gibt Aufschluss über die Relevanz der Auxinverfügbarkeit und des Auxintransports für pflanzliche Entwicklungsprozesse. Vergleichbare Phänotypen wurden durch die Applikation von Inhibitoren des polaren Auxintransports in wildtypischen *A. thaliana* sowie *Lycopersicon esculentum*, *Zea mays* und *Pisum sativum* erzeugt (OKADA et al. 1991; GÄLWEILER et al. 1998; REINHARDT et al. 2000; SCANLON 2003; DEMASON & CHAWLA 2004; WANG et al. 2005).

Wichtige Komponenten des polaren Auxintransports sind die von der *PINFORMED* (*PIN*)-Genfamilie codierten Transportproteine, bei denen es sich um Auxin Efflux Carrier handelt (SIEBERER & LEYSER 2006). In *A. thaliana* umfasst die *PIN*-Genfamilie acht Gene, die gewebespezifische, zum Teil überlappende Expressionsmuster aufweisen. *AtPIN1* (*PIN1*) wird sowohl in der Wurzel als auch im Spross, in Blüten, Blättern und im Sprossapikalmeristem exprimiert (GÄLWEILER et al. 1998; BENKOVA et al. 2003; PAPONOV et al. 2005; BANDYOPADHYAY et al. 2007). Während der Ausfall von *PIN1* gravierende Entwicklungsstörungen zur Folge hat, zeigen Studien von Mutanten anderer *PIN*-Gene, dass deren Ausfall zum Teil erst in



Mehrfachmutanten zur Ausprägung kommt, was sowohl ein Beleg für eine gewisse funktionelle Redundanz einiger *PIN*-Gene als auch für die elementare Bedeutung von *PIN1* im polaren Auxintransport und damit verbundene Entwicklungsprozesse ist (BLILOU et al. 2005).

Mit dem Transport von Auxin ist die Entstehung von lokalen Auxinkonzentrationsgradienten verbunden, durch die die Initiierung und Positionierung von Blättern gesteuert wird (REINHARDT et al. 2003; HEISLER et al. 2005). Nach einem Modell von REINHARDT et al. (2003) erfolgt der Auxintransport innerhalb des Sprossscheitels in den äußeren Zellschichten in akropetaler Richtung. Blattprimordien entstehen an Stellen mit maximaler Auxinkonzentration. Durch den Transport von Auxin in ein Blattprimordium wird in dessen Umgebung eine Absenkung der Auxinkonzentration erzeugt, wodurch erst in einer bestimmten Distanz zu dem bestehenden Primordium ein weiteres Auxinmaximum entstehen kann. Das neue Auxinmaximum hat die Initiierung eines weiteren Primordiums und die anschließende Absenkung der Auxinkonzentration in dessen Umgebung zur Folge. Durch diesen Wechsel von maximaler und minimaler Auxinkonzentration wird die Blattstellung gesteuert. Die durch gezielte Applikation von Auxin auf den Sprossscheitel an der Applikationsstelle auslösbare Initiierung von Blattprimordien in sowohl *PIN1*-Funktionsverlustmutanten als auch mit NPA behandelten und unbehandelten Wildtypen zeigt, dass für den Prozess der Primordieninitiierung ein lokales Auxinmaximum notwendig ist (STIEGER 2002; REINHARDT et al. 2003).

Auch in *E. californica* ist die Initiierung und Positionierung von Blättern durch Hemmung des Auxintransports verändert. Mit NPA behandelte Pflanzen entwickeln im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen weniger Blätter und die wechselständige Blattstellung wird in eine gegenständige oder zweizeilige verändert (MELZER 2005). Ähnliches ist in *P. sativum* zu beobachten, wo unter Einfluss von NPA ebenfalls weniger Blätter gebildet werden und diese missgestaltet sind (DEMASON & CHAWLA 2004). *L. esulentum* und *Z. mays* stellen unter Einfluss von NPA die Bildung neuer Blätter ein und bereits angelegte Blattprimordien entwickeln sich fehlerhaft (REINHARDT et al. 2000; SCANLON 2003; WANG et al. 2005). Allerdings scheint in verschiedenen Arten eine unterschiedliche Sensitivität für NPA zu bestehen, da *L. esulentum* und *Z. mays* bereits bei Einsatz der niedrigen bzw. mittleren für *E. californica* und *P. sativum* verwendeten Konzentrationen die Blattbildung

einstellen und ein Zehntel dieser Konzentration in *L. esculentum* bereits eine Fehlentwicklung der Blätter hervorruft.

Der auffälligste durch NPA verursachte Effekt in *E. californica* war die Veränderung der Blattmorphologie in Form von Fusionen von Blättern und der Reduktion der Blattfiederung (3.2.1.; MELZER 2005). Die Hemmung des polaren Auxintransports hat ähnliche Effekte auf die Fiederblätter von *P. sativum* und *L. esculentum* (DEMASON & CHAWLA 2004; WANG et al. 2005). In vergleichsweise niedrigen Konzentrationen werden in *L. esculentum* ganzrandige Blätter entwickelt, die häufig fusionieren (WANG et al. 2005). In *P. sativum* entspricht der NPA-Phänotyp im Wesentlichen der Mutante des *FLO*-Homologen *UNIFOLIATA* (*UNI*): durch Umwandlung der terminalen Ranke in ein Blättchen entstehen häufig trifoliolate Blätter oder die Blattachse stellt das Wachstum ein und das Blatt besteht aus zwei Blättchen oder ist ganzrandig. Auch Fusionen einzelner Blättchen treten auf. (DEMASON & CHAWLA 2004).

#### 4.2.2 Regulation von *EcFLO* durch Auxin

In *P. sativum* wird bei Hemmung des Auxintransports die Expression des *FLO*-Homologen *UNI* reduziert, was auf eine positive Regulation des Gens durch Auxin zurückgeführt wird (DEMASON & CHAWLA 2004). In *E. californica* kann die Regulation des *FLO*-Homologen *EcFLO* anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien nicht hinreichend geklärt werden. Im Falle der Reprimierung von *EcFLO* durch fehlendes Auxin wie in *P. sativum*, wäre in allen mit NPA behandelten Proben eine geringere Transkriptmenge von *EcFLO* zu erwarten gewesen. Eine geringere Transkriptmenge, indiziert durch eine schwächere Intensität der PCR-Banden im Verhältnis zu Proben unbehandelter Pflanzen, ist jedoch lediglich in sechs von neun der mit NPA behandelten Proben zu erkennen, obwohl alle Pflanze starke morphologische Veränderungen aufwiesen. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass durch die notwendige manuelle Probenentnahme nach verschiedenen PCR-Zyklen bei der hier angewandten semiquantitativen Methode das Ergebnis verfälscht und eine geringfügige Änderung in der Expressionsstärke eines Gens nicht detektiert werden kann. Im vorliegenden Experiment muss diese Möglichkeit in Betracht gezogen werden, da sowohl *EcFLO* als auch *EcSTM* Schwankungen der Transkriptmengen in den gleichen Proben zeigen und darüber hinaus auch die

Amplifikation des Referenzgens leichte Unregelmäßigkeiten aufweist, die diese Proben betreffen. Aus diesen Gründen sollte in weiteren Experimenten eine quantitative Methode wie *real time* PCR angewandt werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für die den unbehandelten Pflanzen ähnlichen Expressionslevel von *EcFLO* ist die Änderung der Expressionsdomäne bei nur geringer Veränderung der Expressionsstärke von *EcFLO* unter Einfluss von NPA. Im Wildtyp von *A. thaliana* ist die Expression von *LFY* in den Blütenprimordien lokalisiert und tritt dort gleichzeitig mit der Expression des Auxintransporters *PIN1* auf, was ein Indiz dafür ist, dass Auxin direkt oder indirekt die Aktivität von *LFY* beeinflusst (VERNOUX et. al 2000; HEISLER et al. 2005). In *PIN1*-Funktionsverlustmutanten ist die Expression von *LFY* dagegen nicht auf diese Domäne beschränkt, sondern erstreckt sich ringförmig um das Apikalmeristem herum (VERNOUX et. al 2000). Die Detektion der *EcFLO*-Aktivität durch *in situ*-Hybridisierung in mit NPA behandelten Pflanzen könnte Aufschluss darüber geben, ob und in welchem Maße die räumliche Aktivität des Gens von der in unbehandelten Pflanzen festgestellten *EcFLO*-Aktivität (BUSCH & GLEISSBERG 2003) abweicht. Durch ein Monitoring des Auxinflusses und der *PIN1*-Lokalisation in mit NPA behandelten und unbehandelten Pflanzen wäre außerdem die Korrelation der *EcFLO*-Expression damit sowohl zeitlich als auch räumlich möglich. Auch die Isolierung und Analyse der Promoterregion von *EcFLO* in Hinblick auf das Vorkommen von auxinresponsiven *cis*-regulatorischen Elementen würde weitere Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Auxin und der Aktivität von *EcFLO* liefern.

#### **4.2.3 Regulation von *EcSTM* durch Auxin**

*KNOX*-Gene werden durch Auxin negativ reguliert und die typischen *KNOX*-Expressionslücken treten in den Apikalmeristemen von Pflanzen mit gestörtem Auxintransport nicht auf, wie Untersuchungen in *A. thaliana* und *Z. mays* zeigen (SCANLON 2003; HAY et al. 2004). Da auch in *E. californica* nahezu gleiche *STM*-Transkriptmengen in Sprossscheiteln von mit NPA behandelten und unbehandelten Pflanzen festgestellt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass *EcSTM* auch in *E. californica* durch Auxin negativ reguliert wird. Weitere Untersuchungen aus *in situ*-Hybridisierung analog der oben für *EcFLO* vorgeschlagenen Experimente können detaillierter Aufschluss geben.

### 4.3 Virus induziertes Gen Silencing (VIGS) in *Eschscholzia californica*

#### 4.3.1 Silencing von *Phytoen-Desaturase (PDS)*

Virus induziertes Gen Silencing (VIGS) erlaubt die gezielte Reprimierung eines Gens durch die Degradierung seiner Transkripte. Diese Methode des posttranskriptionellen Gen Silencings (PTGS) beruht auf einem natürlichen Mechanismus der Pflanze zur Abwehr von Virusinfektionen, durch den virale Elemente erkannt und spezifisch degradiert werden. Auch künstlich in eine Pflanze eingebrachte virale Vektoren werden auf diese Weise erkannt und degradiert. Trägt der Vektor das Fragment eines pflanzlichen Gens, hat dies auch die posttranskriptionelle Degradierung des betreffenden endogenen Gens der Pflanze zur Folge, was VIGS zu einem geeigneten Werkzeug für funktionelle Untersuchungen von Genen macht (z. B. BAULCOMBE 1999; WATERHOUSE & HELLIWELL 2003; BENEDITO et al. 2004). VIGS wurde in verschiedenen Pflanzen, darunter *N. benthamiana*, *A. thaliana*, *L. esculentum*, *P. sativum*, *Papaver somniferum*, *Petunia*, *Aquilegia* als effiziente Methode angewandt (LIU et al. 2002b; CONSTANTIN et al. 2004; HILEMAN et al. 2005; BURCH-SMITH et al. 2006, GOULD & KRAMER 2007; SPITZER et al. 2007).

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektorsystem Tobacco Rattle Virus (TRV) hatte sich gegenüber anderen Vektoren in vorangegangenen Studien als vorteilhaft erwiesen, da konsistente Resultate erzielt und durch den Vektor selbst nur geringe Symptome hervorgerufen werden (RATCLIFF et al. 2001). Dies bestätigte sich in den hier durchgeführten Untersuchungen an *E. californica*. Da die Entwicklung der Pflanzen durch eine Infektion mit dem TRV-Vektor im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen äußerst geringfügig beeinflusst wurden und keine morphologischen Veränderungen feststellbar waren, scheint TRV als Vektor für VIGS und Untersuchungen entwicklungsrelevanter Gene in *E. californica* geeignet zu sein.

Das von dem zur Etablierung der Methode gewählten Gens *Phytoen-Desaturase (PDS)* codierte Enzym ist an der Biosynthese von Carotinoiden beteiligt, die das Chlorophyll vor photooxidativer Zerstörung durch Sauerstoffradikale schützen. Die Hemmung der Carotenoidsynthese führt zum Ausbleichen der Pflanzen (KUMAGAI et al. 1995; DEMMIG-ADAMS & ADAMS 1996). Auf diese Weise ist

die Infektion der Pflanze auch optisch nachweisbar und einfach zu verfolgen (Ruiz et al. 1998).

In *E. californica* erwies sich VIGS als effiziente Methode zum Silencing von *PDS*. Es wurden hohe Infektionsraten (81-100%) erzielt, der Phänotyp stellte sich schnell ein, war deutlich erkennbar und durch RT-PCR nachweisbar. Diese Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit denen anderer Studien überein. Unterschiede in der Effektivität und dem Verlauf von VIGS in verschiedenen Pflanzen hängen in gewissem Maße von äußeren Faktoren wie Temperatur, Tageslänge oder dem Stadium der Pflanzen ab (ROBERTSON 2004). Auch die Wahl der Infektionsmethode kann Einfluss auf die Effektivität von VIGS haben. Während in *E. californica* wie auch in *N. benthamiana* und *P. sativum* (LIU et al. 2002a; CONSTANTIN et al. 2004) die Inokulation über die Blattunterseite hohe Infektionsraten und stark ausgeprägte *PDS*-Funktionsverlustphänotypen liefert, ist in *P. somniferum* die Vakuuminfiltration der ganzen Pflanze notwendig, um einen *PDS*-Funktionsverlustphänotyp zu erhalten (HILEMAN et al. 2005). In *L. esculentum* wird die Infektionsrate durch eine Verletzung der Pflanzen während der Inokulation drastisch gesteigert (LIU et al. 2002b). In *E. californica* zeigte die zusätzliche Verletzung der Pflanzen keinen Effekt. Allerdings konnte durch die direkte Inokulation des Sprossscheitels (WEGE et al. 2007) im Gegensatz zur in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Inokulation der Blattunterseiten auch ein *PDS*-Funktionsverlustphänotyp in Blüten und Früchten beobachtet werden. Des Weiteren kann die Dauer und Intensität des erhaltenen *PDS*-Funktionsverlustphänotyps in verschiedenen Pflanzen variieren. So wurden für *Petunia*, *L. esculentum* und *Pisum sativum* ein drei, vier bzw. sechs Wochen anhaltender Phänotyp, für *Aquilegia* und *Papaver somniferum* ein vier bzw. fünf Monate und für *N. benthamiana* ein unbegrenzt anhaltender *PDS*-Funktionsverlustphänotyp beschrieben (LIU et al. 2002a; LIU et al. 2002b; CONSTANTIN et al. 2004; HILEMAN et al. 2005; SPITZER et al. 2007; GOULD & KRAMER 2007). In *E. californica* waren das zeitliche Auftreten und die Dauer des *PDS*-Silencings einerseits mit dem Alter der Pflanzen korreliert (3.3.1.1.). Andererseits zeigt das periodische Wiederkehren des Phänotyps an nur einigen Pflanzen nach vollständiger Regeneration, dass weitere, individuelle Faktoren bei der Entwicklung des Phänotyps eine Rolle spielen.

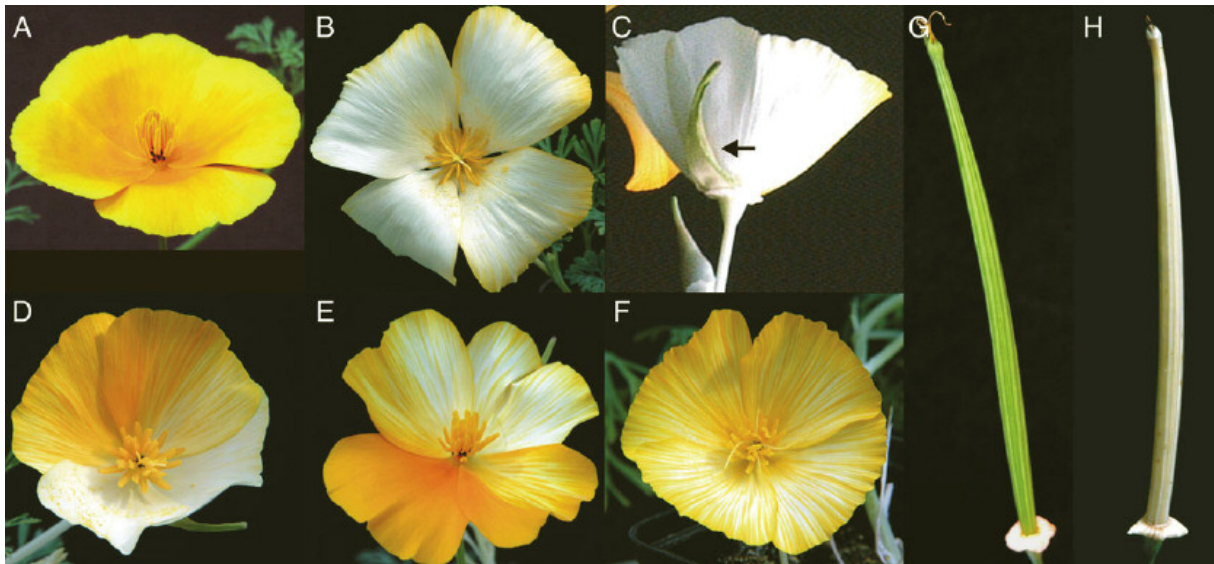


Abb. 4.1: VIGS von *PDS* in Blüten und Früchten von *E. californica*. A) wildtypische Blüte B-F) Entfärbungen der Petalen als Folge des Funktionsverlustes von *EcPDS* durch VIGS; unterschiedlich starke phänotypische Ausprägungen des Funktionsverlustes von *EcPDS* in einzelnen Blüten G) wildtypische Frucht H) Entfärbung der Frucht als Folge des Funktionsverlustes von *EcPDS* (WEGE et al. 2007).

Die in *E. californica* variierende Intensität des *PDS*-Funktionsverlustphänotypen hängt möglicherweise mit dem Transport des Virus innerhalb der Pflanze zusammen. Während der Zell-zu-Zell Transport über die Plasmodesmata sehr langsam und deshalb nur über kurze Distanzen effektiv ist, ist der Langstreckentransport über das Phloem schnell, so dass sich die Symptome systemisch ausbreiten und bereits wenige Tage nach der Infektion an von der Infektionsstelle entfernten Blätter sichtbar sind (SWANSON et al. 2002). In *E. californica* war dem entsprechend die Ausbreitung des Phänotyps von der Infektionsstelle in Richtung des Sprossscheitels und entlang der Leitbündel zu verfolgen. Die häufig zu beobachtenden partiellen Entfärbungen gehen auf eine nicht gleichmäßige Verteilung des Virus im Gewebe zurück (BAULCOMBE 2004). Dort wo Querverbindungen (Anastomosen) zwischen den Leitbündel nicht besonders stark ausgeprägt sind, wie z. B. in sehr jungen Blättern, wird möglicherweise die ungleichmäßige Verteilung des Virus weiter begünstigt, was sich in der zum Teil scharfen Abgrenzung von Gewebe mit und ohne Phänotyp bemerkbar macht (Abb. 3.5).

Die Analyse der Transkriptmengen von *EcPDS* zeigte, dass der *PDS*-Funktionsverlustphänotyp in mit pTRV-*EcPDS* infizierten Pflanzen auf die Reduktion der *PDS*-Transkripte zurückzuführen war. Allerdings konnte in nur elf von 13 Proben eine deutliche Reduktion der Transkriptmenge nachgewiesen werden. Zwei Proben,

eine aus einem vollständig entfärbten und eine aus einem nur partiell entfärbten Blatt, wiesen höhere Transkriptmengen von *EcPDS* auf. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die posttranskriptionelle Degradierung des Gens bereits wieder eingestellt worden. Im Fall der Probe aus partiell entfärbtem Blattgewebe ist es dagegen ebenfalls möglich, dass zum Zeitpunkt der Präparation in dem betreffenden Blatt lediglich ein geringer Teil der *EcPDS*-Transkripte degradiert war. In dieser Hinsicht wäre die genauere Untersuchung der molekularbiologischen Vorgänge während des Infektionsverlaufs interessant.

#### **4.3.2 Die Rolle von *EcFLO* und *EcSTM* in der Blattentwicklung von *E. californica***

*E. californica* weist eine Heteroblastie in Bezug auf die Anzahl der Fiedern aufeinander folgender Blätter in Kombination mit einer hohen Variabilität der Fiederzahl sich entsprechender Blätter einzelner Pflanzen auf (3.3.2.1.; BECKER et al. 2005; MELZER 2005). Der äußerst milde, durch die Infektion mit dem gegen *KNOX*-Gene gerichteten Vektor ausgelöste phänotypische Effekt konnte jedoch durch die statistische Auswertung der Fiederzahlen belegt werden. Eine Verminderung der Transkriptmengen des *KNOX*-Gens *EcSTM* konnte in einigen der mit dem gegen *KNOX*-Gene gerichteten Vektor infizierten Pflanzen nachgewiesen werden, so dass von einer Beteiligung von *EcSTM* an der Blattentwicklung von *E. californica* ausgegangen werden kann. Für die mit dem gegen *EcFLO* gerichteten Vektor infizierten Pflanzen konnte dagegen weder auf phänotypischer noch auf molekularbiologischer Ebene ein auf dem Silencing des Gens beruhender Effekt nachgewiesen werden. Auch die gleichzeitige Infektion mit gegen beide Gene gerichteten Vektoren rief keine Effekte hervor. Ob und in welcher Weise beide Gene, *EcFLO* und *EcSTM*, wie ihre Expression in den Blattprimordien vermuten ließ, an der Blattentwicklung beteiligt sind, kann hier nicht hinreichend geklärt werden. Für das Ausbleiben phänotypischer Veränderungen können verschiedene sowohl biologische als auch technische Ursachen vorliegen, die weiterer Klärung bedürfen.

Im Allgemeinen kann die Interpretation der Ergebnisse vor allem dadurch erschwert werden, dass VIGS niemals vollständig ist und auch geringe Mengen der mRNA des betreffenden Gens dessen Funktion aufrecht erhalten können, so dass ein fehlender Phänotyp nicht unbedingt die Beteiligung des Gens an dem

untersuchten Prozess ausschließt (LU et al. 2003). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der konservierten Funktion von *FLO* als Blütenmeristemidentitätsgen ein Effekt des Silencings im reproduktiven Bereich erwartet wurde, wurden die Pflanzen über einen längeren Zeitraum beobachtet und nur ein Sechstel der mit pTRV-EcFLO infizierten Versuchspflanzen wurde für die Untersuchung der Transkriptmengen von *EcFLO* verwendet. Da die Analyse der *EcSTM*-Transkriptmengen aber zeigt, dass das Gen nicht in allen Pflanzen inaktiviert wurde, sollten die Untersuchungen in weiteren Versuchen grundsätzlich für eine größere Anzahl von Pflanzen erstellt werden. Ein weiterer Faktor, der bei der Erstellung und Interpretation der Transkriptmengen berücksichtigt werden sollte ist, dass auch der Zeitpunkt des maximalen Effektes von Pflanze zu Pflanze variieren kann (LU et al. 2003; ROBERTSON 2004). Die Analyse der Transkriptmengen von *EcSTM* und *EcPDS* zeigen, dass ein Silencing nicht in allen Pflanzen des jeweiligen Versuchansatzes nachgewiesen werden konnte, obwohl zumindest im Fall von *EcPDS* der Ausfall des Gens in allen Pflanzen einen deutlichen Phänotyp erzeugte. Aufgrund dessen sollten in weiteren Experimenten die Transkriptmengen der Zielgene in den infizierten Pflanzen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Methode der sqRT-PCR kritisch betrachtet werden und aufgrund ihrer Fehleranfälligkeit beim Nachweis von geringen Unterschieden der Transkriptmengen möglichst durch eine quantitative Methode wie *real time* PCR ersetzt werden.

Weitere Gründe für das Ausbleiben von Phänotypen können die Wahl des Vektors oder die Infektionsmethode sein. Ein Vorteil von TRV gegenüber anderen Viren ist dessen Fähigkeit Meristeme zu infizieren (MATTHEWS 1999; RATCLIFF et al. 2001), was die Untersuchung von im Apikalmeristem aktiven Transkriptionsfaktoren ermöglicht. In *Nicotiana benthamiana* wurde das Silencing des *FLO/LFY*-Homologen und eines homöotischen Blütengens und in *Aquilegia* ebenfalls das Silencing eines homöotischen Blütengens durch TRV erfolgreich demonstriert (RATCLIFF et al. 2001; LIU et al. 2004; GOULD & KRAMER 2007). Da in *E. californica* in einigen Pflanzen eine Reduktion der Transkriptmenge von *EcSTM* in aus dem Apikalmeristem extrahierten Proben festgestellt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass TRV auch in *E. californica* grundsätzlich in der Lage ist, in Meristeme einzudringen. Wie bereits für *EcPDS* dargelegt, hat die Infektionsmethode in *E. californica* offensichtlich



Einfluss auf die Entwicklung bzw. Ausbreitung des Phänotyps. Durch die Inokulation des Sprossscheitels (WEGE et al. 2007) kann vielleicht auch das Silencing von Transkriptionsfaktoren im Apikalmeristem hervorgerufen bzw. verstärkt werden.

Inzwischen sind neben *EcSTM* weitere *KNOX*-Gene, *EcKNAT1*, *EcKNAT2/6* und ein weiteres *STM*-Homologes, *EcSTM2*, aus *E. californica* bekannt (MEYER 2006). Während *EcSTM* in verschiedenen Entwicklungsstadien der Blätter konstant aktiv ist, werden die drei anderen *KNOX*-Gene in sehr jungen Blattprimordien zunächst reprimiert und in einer späteren Entwicklungsphase wieder aktiviert, was ein Hinweis auf deren mögliche Funktion in einer späteren Phase der Blattentwicklung ist (MEYER 2006). Eine funktionelle Redundanz verschiedener *KNOX*-Gene kann nicht ausgeschlossen werden. In dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuch wurde ein Vektor mit einem Fragment aus dem konservierten Bereich der *KNOX*-Gene verwendet mit dem es möglich sein sollte, verschiedene *KNOX*-Gene gleichzeitig auszuschalten. Eine gleichzeitige durch VIGS ausgelöste Reprimierung mehrerer bzw. aller *KNOX*-Gene hätte allerdings stärkere Phänotypen erwarten lassen, die aufgrund der Funktion der *KNOX*-Gene im Apikalmeristem möglicherweise in der Einstellung des Wachstums der Pflanze resultiert hätten. Aufgrund dessen ist es wahrscheinlich, dass nicht alle *KNOX*-Gene von VIGS erfasst wurden.

#### **4.3.3 Die Evolution der genetischen Regulation von Fiederblättern innerhalb der Eudikotylen**

In verschiedenen Arten innerhalb der Eudikotylen werden *FLO*- und/oder *KNOX*-Gene während der Fiederblattentwicklung exprimiert (Abb. 1.3). Der Zusammenhang von Expression und Funktion dieser Gene bei der Fiederbildung wurde bisher lediglich für wenige Arten untersucht. Unklar ist darüber hinaus, ob die Fiederblattentwicklung in basal abspaltenden Eudikotylen durch *FLO* oder durch *KNOX* oder durch das Zusammenspiel beider reguliert wurde. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass in *E. californica* das *FLO*-Homologe *EcFLO* in den sich entwickelnden Fiederblättern exprimiert wird (BUSCH & GLEISSBERG 2003). Somit stellte sich die Frage, ob es innerhalb der basal abspaltenden Eudikotylen einen allein auf *FLO* basierenden Mechanismus der Fiederbildung gibt, wie es in *Pisum sativum* (HOFER et al. 1997) der Fall ist. Da GROOT et al. (2005) die mit *EcFLO*

---

gleichzeitige Expression des *KNOX*-Gens *EcSTM* während der Fiederbildung in den Blättern von *E. californica* feststellten, wurde die gemeinsame Regulation der Fiederbildung durch beide Gene wahrscheinlich. Die zur Überprüfung dieser Hypothesen notwendigen funktionellen Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. *E. californica* sollte als Modell für die Ranunculales, die Schwestergruppe aller anderen Eudikotylen, Aufschluss über den ursprünglich möglichen genetischen Regulationsweg der Fiederblattentwicklung innerhalb der Eudikotylen geben.

Die Ergebnisse des VIGS-Experiments machen die funktionelle Beteiligung von *EcSTM* an der Fiederblattentwicklung von *E. californica* sehr wahrscheinlich, während es hier keine Hinweise für eine Funktion von *EcFLO* in der Blattentwicklung gab. Dies liefert Hinweise darauf, dass der ursprüngliche Zustand der Potenz zur Fiederblattentwicklung innerhalb der Eudikotylen durch eine Beteiligung von *KNOX*-Genen gekennzeichnet ist. Die gleichzeitige Beteiligung von *FLO* kann jedoch weiterhin als ursprünglicher Zustand nicht ausgeschlossen werden, da für die fehlenden *EcFLO*-Funktionsverlust-Phänotypen hier möglicherweise technische Ursachen vorliegen und weitere Untersuchungen u. a. mit den vorgeschlagenen Veränderung der Experimente notwendig sind. Weitere Untersuchungen sind ebenfalls notwendig, um verlässliche Einblicke in die Evolution der genetischen Steuerung der Fiederblattentwicklung zu gewinnen. Dazu sollte eine repräsentative Artenauswahl innerhalb der Ranunculales hinsichtlich der Expression und Funktion von *FLO*- und *KNOX*-Genen in der Fiederblattentwicklung untersucht werden. Auch sollten generell weitere Arten hinsichtlich der Beteiligung dieser Gene an der Fiederblattentwicklung untersucht werden und bekannte Studien von *KNOX*-Genen in der Fiederblattentwicklung (Abb. 1.3) durch die Untersuchung des jeweiligen *FLO*-Gens während der vegetativen Entwicklung ergänzt werden.

## 5. Zusammenfassung

Sowohl *FLORICAULA* (*FLO*) als auch *KNOTTED1*-like Homöobox (*KNOX*)-Gene können neben ihren konservierten Funktionen in der Achsenentwicklung in verschiedenen Arten der Eudikotylen eine Funktion in der Entwicklung von Fiederblättern übernehmen. Ungeklärt ist allerdings, welcher genetische Regulationsweg der Fiederblattentwicklung in Hinblick auf *FLO* und *KNOX*-Gene der für die Eudikotylen ursprüngliche ist. Funktionelle Untersuchungen, die eine Rolle der Gene in der Entwicklung von Fiederblättern belegen, liegen derzeit nur für wenige Arten, die zudem aus phylogenetisch abgeleiteten Gruppen stammen, vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung dieser Gene für die Fiederblattentwicklung von *Eschscholzia californica* als Modell für die Ranunculales, die Schwestergruppe aller anderen Eudikotylen, mit verschiedenen Methoden untersucht.

Es wurde an der Etablierung eines *Agrobacterium*-vermittelten Transfomations-systems, das die Erzeugung von stabilen Mutanten ermöglichen soll, gearbeitet. Unreife Samen erwiesen sich dabei als das geeignetere Ausgangsmaterial zur Produktion regenerationsfähiger somatischer Embryonen im Vergleich zu Keimlingen. Allerdings blieben zahlreiche Versuche der Transformation erfolglos. Die Gründe dafür werden ausführlich diskutiert und neue Versuchsanordnungen vorgeschlagen.

Die Bedeutung von Auxin für die Entwicklung der Blätter und die Untersuchung der Interaktion von *ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA FLORICAULA* (*EcFLO*) und des *KNOX*-Gens *ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA SHOOT MERISTEMLESS* (*EcSTM*) mit Auxin wurde durch chemische Hemmung des Auxintransports untersucht. Die Hemmung des Auxintransports resultierte in gravierenden Störungen der Blattpositionierung und -morphologie. Eine Veränderung der Expression von *EcFLO* oder *EcSTM* konnte in diesen Pflanzen trotz einer drastischen Reduktion der Blattfiederung nicht nachgewiesen werden. Zur Erzeugung von Funktionsverlustmutanten von *EcFLO* und *KNOX*-Genen in *E. californica* wurde Virus induziertes Gen Silencing (VIGS) angewandt. Auch VIGS von *EcFLO* rief keine phänotypischen Veränderungen der Blätter hervor. Das Silencing des *KNOX*-Gens *EcSTM* zeigte dagegen in einigen Pflanzen eine Verminderung der Blattfiederung. Auch molekularbiologisch konnte das Silencing von *EcSTM*, nicht aber das Silencing von *EcFLO* nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse belegen die Notwendigkeit des ungestörten Auxintransports für die Blattentwicklung von *E. californica* und machen die Beteiligung des *KNOX*-Gens *EcSTM* an der Blattentwicklung wahrscheinlich. Die Beteiligung von *EcFLO* an der Fiederbildung konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- AHEARN K. P., JOHNSON H. A., WEIGEL D., WAGNER D. R. (2001): *NFL1*, a *Nicotiana tabacum* LEAFY-Like Gene, Controls Meristem Initiation and Floral Structure. *Plant Cell Physiol.* 42,10: 1130-1139
- BANDYOPADHYAY A., BLAKESLEE J. J., LEE O. R., MRAVEC J., SAUER M., TITAPIWATANAKUN B., MAKAM S. N., BOUCHARD R., GEISLER M., MARTINOIA E., FRIML J., PEER W. A., MURPHY A. S. (2007): Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanism. *Biochemical Society Transactions* 35,1: 137-141
- BAULCOMBE D. (2004): RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363
- BAULCOMBE D. C. (1999): Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 109-113
- BECKER A., GLEISSBERG S., SMYTH D. R. (2005): Floral and Vegetative Morphogenesis in California Poppy (*Eschscholzia californica* CHAM.). *International Journal of Plant Sciences* 166,4: 537-555
- BELNY M., HEROUART D., THOMASSET B., DAVID H., JACQUIN-DUBREUIL A., DAVID A. (1997): Transformation of *Papaver somniferum* cell suspension cultures with *sam1* from *A. thaliana* results in cell lines of different S-adenosyl-L-methionine synthetase activity. *Physiologia Plantarum* 99: 233-240
- BENEDITO V. A., VISSER P. B., ANGENENT G. C., KRENS F. A. (2004): The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genetics and Molecular Research* 3,3: 323-341
- BENKOVA E., MICHNIEWICZ M., SAUER M., TEICHMANN T., SEIFERTOVA D., JÜRGENS G., FRIML J. (2003): Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell* 115: 591-602
- BHARATHAN G., GOLIBER T. E., MOORE C., KESSLER S., PHAM T., SINHA N. (2002): Homologies in Leaf Form Inferred from KNOX1 Gene Expression During Development. *Science* 296: 1858-1860
- BLAZQUEZ M. A., SOOWAL L. N., LEE I., WEIGEL D. (1997): *LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* 124: 3825-3844
- BLILOU I., XU J., WILDWATER M., WILLEMSSEN V., PAPONOV I., FRIML J., HEIDSTRA R., AIDA M., PALME K., SCHERES B. (2005): The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433,6:39-44
- BURCH-SMITH T. M., SCHIFF M., LIU Y., DINESH-KUMAR S. P. (2006): Efficient Virus-Induced Gene Silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142: 21-27
- BUSCH A. & GLEISSBERG S. (2003): *EcFLO*, a *FLORICAULA*-like gene form *Eschscholzia californica* is expressed during organogenesis at the vegetative shoot apex. *Planta* 217: 841-848
- CARIMI F., DE PASQUALE F., CRESCIMANNO F. G. (1999): Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. *Plant Cell Reports* 18: 935-940

- CARMONA M. J., CUBAS P., MARTINEZ-ZAPATER J. M. (2002): *VFL*, the Grapevine *FORICAULA/LEAFY* Ortholog, Is Expressed in Meristematic Regions Independently of Their Fate. *Plant Physiology* 130: 68-77
- CARROLL S. B. (2005): *Endless Forms Most Beautiful*. W. W. Norton & Company, Ltd., London
- CERVERA M., PINA J. A., JUÁREZ J., NAVARRO L., PENA L. (1998): *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports* 18: 271-278
- CHAMPAGNE C. E. M., GOLIBER T. E., WOJCIECHOWSKI M. F., MEI R. W., TOWNSLEY B. T., WANG K., PAZ M. M., GEETA R., SINHA N. R. (2007): Compound Leaf Development and Evolution in the Legumes. *The Plant Cell* 19: 3369-3378
- CHEN P.-Y., WANG C.-K., SOONG S.-C., TO K.-Y. (2003): Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding* 11: 287-293
- CHITTY J. A., ALLEN R. S., FIST A. J., LARKIN P. J. (2003): Genetic transformation in commercial Tasmanian cultivars of opium poppy, *Papaver somniferum*, and movement of transgenic pollen in the field. *Functional Plant Biology* 30: 1045-1058
- CHO H.-T. & COSGROVE D. J. (2000): Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97,17: 9783-9788
- COEN E. S. & MEYEROWITZ E. M. (1991): The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37
- COEN E. S., ROMERO J. M., DOYLE S., ELLIOTT R., MURPHY G., CARPENTER R. (1990): *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311-1322
- CONSTANTIN G. D., KRATH B. N., MACFARLANE S. A., NICOLAISEN M., JOHANSEN I. E., LUND O. S. (2004): Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *The Plant Journal* 40: 622-631
- DEAN G., CASSON S., LINDSEY K. (2004): *KNAT6* gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation. *Plant Molecular Biology* 54: 71-84
- DEMASON D. A. & CHAWLA R. (2004): Roles for auxin during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). *Planta* 218: 435-448
- DEMASON D. A. & SCHMIDT R. J. (2001): Roles of the *Uni* Gene in Shoot and Leaf Development of pea (*Pisum sativum*): Phenotypic Characterization and Leaf Development in the *uni* and *uni-tac* Mutants. *International Journal of Plant Sciences* 162,5: 1033-1051
- DEMMIG-ADAMS B. & ADAMS W. W. (1996): The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1,1: 21-26
- DOYLE J. A. & ENDRESS P. K. (2000): Morphological Phylogenetic Analysis of basal Angiosperms: Comparison and Combination with Molecular Data. *International Journal of Plant Sciences* 161 (6 Suppl.): S121-S153

- FROHMAN M. A. & MARTIN G. R. (1989): Rapid amplification of cDNA ends using nested primers. *Technique* 1: 165-173
- GÄLWEILER 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
- GELVIN S. B. (2003): Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67,1: 16-37
- GILBERT S. F. (2003): The morphogenesis of evolutionary developmental biology. *International Journal of Developmental Biology*. 47: 467-477
- GIROUX R. W. & PAULS K. P. (1997): Characterization of somatic embryogenesis-related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Molecular Biology* 33: 393-404
- GLEISSBERG S. (2004): Comparative Analysis of Leaf Shape Development in *Eschscholzia californica* and Other Papaveraceae-Eschscholzioideae. *American Journal of Botany* 91,13: 306-312
- GOULD B. & KRAMER E. (2007): Virus-induced gene silencing as a tool for functional analysis in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant Methods* 3: 6-17
- GOURLAY C. W., HOFER J. M. I., ELLIS T. H. N. (2000): Pea Compound Leaf Architecture Is Regulated by Interactions among the Genes *UNIFOLIATA*, *COCHLEATA*, *AFILA* and *TENDRILL-LESS*. *Plant Cell* 12: 1279-1294
- GROOT E. P., SINHA N., GLEISSBERG S. (2005): Expression patterns of *STM*-like *KNOX* and *Histone H4* genes in shoot development of the dissected-leaved basal eudicot plants *Chelidonium majus* and *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Plant Molecular Biology* 58: 317-331
- HAGEMANN W. & GLEISSBERG S. (1996): Organogenetic capacity of leaves: the significance of marginal blastozones in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* 199: 121-152
- HAKE S., VOLLBRECHT E., FREELING M. (1989): Cloning *Knotted*, the dominant morphological mutant in maize using *Ds2* as a transposon tag. *The EMBO Journal* 8,1: 15-22
- HAREVEN D., GUTFINGER T., PARNIS A., ESHED Y., LIFSCHITZ E. (1996): The Making of a Compound Leaf: Genetic Manipulation of Leaf Architecture in Tomato. *Cell* 84: 735-744
- HAY A. & TSIANTIS M. (2006): The genetic basis for differences in leaf form between *Arabidopsis thaliana* and its wild relative *Cardamine hirsuta*. *Nature Genetics* 38,8: 942-947
- HAY A., CRAFT J., TSIANTIS M. (2004): Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? *BioEssays* 26,4: 395-404
- HEISLER M. G., OHNO C., DAS P., SIEBER P., REDDY G. V., LONG J. A., MEYEROWITZ E. M. (2005): Patterns of Auxin Transport and Gene Expression during Primordium Development Revealed by Live Imaging of the *Arabidopsis* Inflorescence Meristem. *Current Biology* 15: 1899-1911

- HILEMAN L. C., DREA S., MARTINO DE G., LITT A., IRISH V. F. (2005): Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *The Plant Journal* 44: 334-341
- HOFER J., GOURLAY C., MICHAEL A., ELLIS T. H. N. (2001): Expression of a class 1 *knotted1*-like homeobox gene is down-regulated in pea compound leaf primordia. *Plant Molecular Biology* 45: 387-398
- HOFER J., TURNER L., HELLENS R., AMBROSE M., MATTHEWS P., MICHAEL A., ELLIS N. (1997): UNIFOLIATA regulates leaf and flower morphogenesis in pea. *Current Biology* 7: 581-587
- JANSSEN B.-J., LUND L., SINHA N. (1998): Overexpression of a Homeobox Gene, *LeT6*, Reveals Indeterminate Features in the Tomato Compound Leaf. *Plant Physiology* 117: 771-786
- JEFFERSON R. A., KAVANAGH T. A., BEVAN M. W. (1987): GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6,13: 3901-3907
- KASSEM M. A. & JACQUIN A. (2001): Somatic embryogenesis, rhizogenesis, and morphinan alkaloids production in two species of opium poppy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1,2: 70-78
- KAVATHEKAR A. K. & GANAPATHY P. S. (1973): Embryoid formation in *Eschscholzia californica*. *Current Science* 42: 671-673
- KAVATHEKAR A. K. GANAPATHY P. S, JOHRI B. M. (1977): Chilling Induces Development of Embryoids into Plantlets in *Eschscholzia*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 81: 358-363
- KIM M., PHAM T., HAMIDI A., MCCORMICK S., KUZOFF R. M., SINHA N. (2003): Reduced leaf complexity in tomato wiry mutants suggests a role for *PHAN* and *KNOX* genes in generating compound leaves. *Development* 130: 4405-4415
- KIM S. W., MIN B. W., LIU J. R. (1999): High frequency plant regeneration from immature ovule-derived embryogenic cell suspension cultures of *Chelidonium majus* var. *asiaticum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 125-129
- KONCZ C. & SCHELL J. (1986): The promoter of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383-396
- KUMAGAI M. H., DONSON J., DELLA-CIOPPA G., HARVEY D., HANLEY K., GRILL L. K. (1995): Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 1679-1683
- LAUX T & JÜRGENS G. (1997): Embryogenesis: A New Start in Life. *The Plant Cell* 9: 989-1000
- LEE J & PEDERSEN H. (2001): Stable Genetic Transformation of *Eschscholzia californica* Expressing Synthetic Fluorescent Proteins. *Biotechnology Progress* 17: 247-251
- LEFANU B. (1936): Auxin and Correlative Inhibition. *New Phytologist*. 35: 205-220

- LIU Y., NAKAYAMA N., SCHIFF M., LITT A., IRISH V. F., DINESH-KUMAR S. P. (2004): Virus induced gene silencing of a *DEFICIENS* ortholog in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology* 54: 701-711
- LIU Y., SCHIFF M., DINESH-KUMAR S. P. (2002b): Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal* 31,6: 777-786
- LIU Y., SCHIFF M., MARATHE R., DINESH-KUMAR S. P. (2002a): Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 30,4: 415-429
- LU R., MARTIN-HERNANDEZ A. M., PEART J. R., MALCUIT I., BAULCOMBE D. C. (2003): Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30: 296-303
- MADDISON D. R. & MADDISON W. P. (2000): *MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.0.* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- MAIZEL A., BUSCH M. A., TANAHASHI T., PERKOVIC J., KATO M., HASEBE M., WEIGEL D. (2005): The Floral Regulator *LEAFY* Evolves by Substitutions in the DNA Binding Domain. *Science* 308: 260-263
- MELZER B. (2005): Die Wirkung von Phytohormonen auf Phyllotaxis und Fiederentwicklung in den Papaveraceae. Diplomarbeit, Institut für Spezielle Botanik und Botanischer Garten, Universität Mainz.
- MEYER S. (2006): Der *KNOX*-Pathway in *Eschscholzia californica*. Diplomarbeit, Institut für Spezielle Botanik und Botanischer Garten, Universität Mainz.
- MOLINERO-ROSALES N., JAMILENA M., ZURITA S., GOMEZ P., CAPEL J., LOZANO R. (1999): *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. *The Plant Journal* 20,6: 685-693
- MOURADOV A., CREMER F., COUPLAND G. (2002): Control of Flowering Time: Interacting Pathways as a Basis for Diversity. *The Plant Cell*, 14 (Suppl. 1): 111-130
- NESSLER C. L. (1982): Somatic embryogenesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Physiologia Plantarum* 55: 453-458
- NG M. & YANOFSKY M. F. (2001): Activation of the Arabidopsis B Class Homeotic Genes by *APETALA1*. *Plant Cell* 13: 739-753
- OKADA K., UEDA J., KOMAKI M. K., BELL C. J., SHIMURA Y. (1991): Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of *Arabidopsis* Floral Bud Formation. *Plant Cell* 3: 677-684
- PAPONOV I. A., TEALE W. D., TREBAR M., BLILOU I., PALME K. (2005): The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *TRENDS in Plant Science* 10,4:170-177
- PARCY F., NILSON O., BUSCH M A., LEE I., WEIGEL D. (1998): A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395: 561-566
- PARK S.-U., & FACCHINI P. J. (1999): High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration in California poppy, *Eschscholzia californica* Cham. *Plant Cell Reports* 19: 421-426



- PARK S.-U., & FACCHINI P. J. (2000a): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 19: 1006-1012
- PARK S.-U., & FACCHINI P. J. (2000b): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *Journal of Experimental Botany* 51,347: 1005-1016
- PARK S.-U., & FACCHINI P. J. (2001): Somatic embryogenesis from embryogenic cell suspension cultures of California poppy, *Eschscholzia californica* Cham. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37: 35-39
- PAUTOT V., DOCKX J., HAMANT O., KRONENBERGER J., GRANDJEAN O., JUBLOT D., TRAAS J. (2001): *KNAT2*: Evidence for a Link between Knotted-like Genes and Carpel Development. *Plant Cell* 13: 1719-1734
- RATCLIFF F., MARTIN-HERNANDEZ A. M., BAULCOMBE D. C. (2001): Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* 25,2: 237-254
- REINHARDT D., MANDEL T., KUHLEMEIER C. (2000): Auxin Regulates the Initiation and Radial Position of Plant Lateral Organs. *Plant Cell* 12: 507-518
- REINHARDT D., PESCE E.-R., STIEGER P., MANDEL T., BALTENSPERGER K., BENNETT M., TRAAS J., FRIML J., KUHLEMEIER C. (2003): Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426: 255-260
- REISER L., SANCHEZ-BARACALDO P., HAKE S. (2000): Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of *knox* homeobox genes. *Plant Molecular Biology* 42: 151-166
- ROBERTSON D. (2004): VIGS Vectors For Gene Silencing: Many Target, Many Tools. *Annual Review of Plant Biology* 55: 495-519
- ROTTMANN W. H., MEILAN R., SHEPPARD L. A., BRUNNER A. M., SKINNER J. S., MA C., CHENG S., JOUANIN L., PILATE G., STRAUSS S. H. (2000): Diverse effects of overexpression of *LEAFY* and *PTFL*, a poplar (*Populus*) homolog of *LEAFY/FLORICAULA*, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant Journal* 22,3: 235-245
- RUIZ M T., VOINNET O., BAULCOMBE D. C. (1998): Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing. *The Plant Cell* 10: 937-946
- SACHS T. (1975): The Control of the Differentiation of Vascular Networks. *Annals of Botany* 39: 197-204
- SAGARE A. P., LEE Y. L., LIN T. C., CHEN C. C, TSAY H. S. (2000): Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) – a medicinal plant. *Plant Science* 160: 139-147
- SCANLON M. J. (2003): The Polar Auxin Transport Inhibitor *N*-1-Naphthylphthalamic Acid Disrupts Leaf Initiation, *KNOX* Protein Regulation, and Formation of Leaf Margins in Maize. *Plant Physiology* 133: 597-605
- SCOFIELD S. & J. A. H. MURRAY (2006): *KNOX* gene function in plant stem cell niches. *Plant Molecular Biology* 60: 929-946

- SEABROOK J. E. A. & DOUGLASS L. K. (2001): Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cells Reports* 20: 175-182
- SERIKAWA K., MARTINEZ-LABORDA A., ZAMBRYSKI P. (1996): Three *knotted1*-like homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 32: 673-683
- SIEBERER T. & LEYSER O. (2006): Auxin Transport, but in Which Direction? *Science* 312: 858-860
- SNOW M. & SNOW R. (1937): Auxin and Leaf Formation. *New Phytologist* 36,1: 1-18
- SOUTHERTON S. G., STRAUSS S. H., OLIVE M. R., HARCOURT R. L., DECROOQ V., ZHU X., LLEWELLYN D. J., PEACOCK W. J., DENNIS E. S. (1998): *Eucalyptus* has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*. *Plant Molecular Biology* 37: 897-910
- SPITZER B., ZVI M. M. B., OVADIS M., MARHEVKA E., BARKAI O., EDELBAUM O., MARTON I., MASCI T., ALON M., MORIN S., ROGACHEV I., AHARONI A., VAINSTEIN A. (2007): Reverse Genetics of Floral Scent: Application of Tobacco Rattle Virus-Based Gene Silencing in Petunia. *Plant Physiology* 145: 1241-1250
- SPSS 15.0 für Windows. Version 15.0.1. (22 Nov 2006). SPSS Inc., Chicago.
- STEVENS P. F. (2001 onwards): Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, June 2008. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- STIEGER P. A., REINHARDT D., KUHLEMEIER C. (2002): The auxin influx carrier is essential for correct leaf positioning. *The Plant Journal* 32: 509-517
- SULAIMAN I. M., RANGASWAMY N. S., BABU C. R. (1991): Formation of plantlets through somatic embryogeny in the Himalayan blue poppy, *Meconopsis simplicifolia* (Papaveraceae). *Plant Cell Reports* 9: 582-585
- SWANSON M., BARKER H., MACFARLANE S. A. (2002): Rapid vascular movement of tobnaviruses does not require coat protein: evidence from mutated and wild-type viruses. *Annals of Applied Biology* 141: 259-266
- THEISSEN G. & MELZER R. (2007): Molecular Mechanisms Underlying Origin and Diversification of the Angiosperm Flower. *Annals of Botany* 100: 603-619
- THEISSEN G. (2001): Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 75-85
- TSIANTIS M. & HAY A. (2003): Comparative plant development: the time of the leaf? *Nature Reviews Genetics* 4: 169-180
- VERDEIL J.-L., ALEMANN L., NIEMENAK N., T. J. TRANBERGER (2007): Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *TRENDS in Plant Science* 12,6: 245-252
- VERNOUX T., KRONENBERGER J., GRANDJEAN O., LAUFS P., TRAAS J. (2000): *PIN-FORMED 1* regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development* 127: 5157-5165
- VINTERHALTER B. & VINTERHALTER D. (2002): Propagation of *Chelidonium majus* L. by somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum* 45,4: 489-493
- VOLLBRECHT E., VEIT B., SINHA N., HAKE S. (1991): The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* 350: 241-243

- 
- WALTON E. F., PODIVINSKY E., WU R.-M. (2001): Bimodal patterns of floral gene expression over the two seasons that kiwifruit flowers develop. *Physiologia Plantarum* 111: 396-404
- WANG H., JONES B., LI Z., FRASSE P., DELALANDE C., REGAD F., CHAABOUNI S., LATCHE A., PECH J.-C., BOUZAYEN M. (2005): The Tomato *Aux/IAA* Transcription Factor *IAA9* Is Involved in Fruit Development and Leaf Morphogenesis. *The Plant Cell* 17: 2676-2692
- WATERHOUSE P. M. & HELLIWELL C. A. (2003): Exploring Plant Genomes by RNA-Induced Gene Silencing. *Nature Reviews Genetics* 4: 29-38
- WEGE S., SCHOLZ A., GLEISSBERG S., BECKER A. (2007): Highly Efficient Virus-induced Gene Silencing (VIGS) in California Poppy (*Eschscholzia californica*): An Evaluation of VIGS as a Strategy to Obtain Functional Data from Non-model Plants. *Annals of Botany* 100: 641-649
- WEIGEL D. & NILSSON O. (1995): A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377: 495-500
- WILLIAMS R. D. & ELLIS B. E. (1993): Alkaloids from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed *Papaver somniferum* cultures. *Phytochemistry* 32,3: 719-723
- YANISH-PERRON C., VIEIRA J., MESSING J. (1985): Improved M13 cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119
- YOSHIMATSU K & SHIMOMURA K. (1992): Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) with *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724. *Plant Cell Reports* 11: 132-136

## **Anhang**

Anhang Tab. 1: Anzahl der Blätter pro Pflanze zu best. Zeitpunkten des Virus induzierten Silencings von *EcFLO* und *EcKNOX* (n.b.: Wert nicht bestimmt).

Pflanzen-Nr.	Anzahl der Blätter			
	Woche1	Woche2	Woche5	Woche9
<b>unbehandelt</b>				
121	4	11	n.b.	n.b.
122	4	11	21	28
123	4	11	20	30
124	4	11	n.b.	n.b.
125	4	11	19	26
126	4	10	19	24
127	4	11	20	n.b.
128	4	11	21	28
129	4	11	20	28
130	4	11	20	27
131	4	12	24	29
132	4	11	25	30
133	4	10	19	26
134	4	11	19	25
135	4	11	24	33
136	4	11	21	31
137	4	10	17	23
138	4	10	18	25
139	4	8	16	22
140	4	12	19	30
141	4	10	20	30
142	4	9	15	n.b.
143	4	10	17	29
144	4	10	17	n.b.
145	4	8	n.b.	n.b.
146	4	10	17	25
147	4	10	18	23
148	4	9	16	24
149	4	11	20	n.b.
150	4	11	20	31
<b>pTRV2</b>				
1	4	11	18	27
2	4	13	21	28
3	4	9	15	n.b.
4	4	11	19	31
5	4	10	18	21
6	4	9	16	23
7	4	11	18	23
8	4	12	20	n.b.
9	4	12	18	25
10	4	11	19	26
11	4	11	19	25
12	4	12	22	29
13	4	11	22	31
14	4	11	22	n.b.
15	4	11	18	27
16	4	9	15	20
17	4	10	17	23

Anhang Tab. 1: Fortsetzung

<b>pTRV2</b>				
18	4	10	19	n.b.
19	4	11	15	22
20	4	11	17	23
21	4	10	20	27
22	4	10	17	22
23	4	10	16	25
24	4	11	20	n.b.
25	4	10	18	23
26	4	10	19	n.b.
27	4	9	15	20
28	4	9	17	22
29	4	10	20	27
30	4	8	17	23
<b>pTRV-EcFLO</b>				
31	4	n.b.	14	20
32	4	10	15	23
33	4	11	18	n.b.
34	4	10	17	25
35	4	9	14	22
36	4	11	18	n.b.
37	4	10	15	20
38	4	10	18	25
39	4	9	18	n.b.
40	4	11	19	25
41	4	7	11	19
42	4	9	15	18
43	4	10	19	n.b.
44	4	11	19	30
45	4	9	15	20
46	4	10	18	25
47	4	10	20	24
48	4	10	21	28
49	4	10	19	26
50	4	11	18	25
51	4	10	18	26
52	4	13	21	30
53	4	10	18	29
54	4	10	16	23
55	4	9	15	20
56	4	9	7	26
57	4	10	19	26
58	4	11	15	20
59	4	10	16	28
60	4	10	19	n.b.
<b>pTRV-EcKNOX</b>				
61	4	11	18	22
62	4	10	13	20
63	4	10	15	23
64	4	11	16	21
65	4	11	18	26
66	4	10	18	26
67	4	10	15	21
68	4	11	17	23

Anhang Tab. 1: Fortsetzung

<b>pTRV-EcKNOX</b>					
69	4	10	19	n.b.	
70	4	10	22	n.b.	
71	4	12	21	29	
72	4	13	18	24	
73	4	12	22	n.b.	
74	4	11	18	28	
75	4	10	16	23	
76	4	10	17	23	
77	4	10	18	26	
78	4	10	18	20	
79	4	10	19	27	
80	4	10	20	29	
81	4	9	16	21	
82	4	10	18	n.b.	
83	4	10	19	25	
84	4	9	15	23	
85	4	9	18	21	
86	4	11	18	25	
87	4	10	18	n.b.	
88	4	10	18	23	
89	4	9	16	24	
90	4	12	n.b.	n.b.	
<b>pTRVEcFLO+pTRV-EcKNOX</b>					
151	4	10	15	22	
152	4	9	17	25	
153	4	11	20	26	
154	4	9	17	n.b.	
155	4	9	17	24	
156	4	10	18	27	
157	4	9	16	n.b.	
158	4	10	19	n.b.	
159	4	11	22	27	
160	4	10	19	n.b.	
161	4	12	23	n.b.	
162	4	10	16	n.b.	
163	4	8	18	26	
164	4	11	n.b.	n.b.	
165	4	9	17	22	

Anhang Tab. 2: Anzahl der Fiedern pro Blatt an best. Blättern von Pflanzen während des Virus induzierten Silencings von *EcFLO* und *EckNOX* (n.b.: Wert nicht bestimmt).

Pflanzen- Nr.	Fiederzahl				
	Blatt 5	Blatt 8	Blatt 11	Blatt 14	Blatt 17
<b>unbehandelt</b>					
121	23	n.b.	40	n.b.	n.b.
122	31	33	43	47	n.b.
123	24	36	66	83	n.b.
124	26	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
125	29	n.b.	29	40	33
126	33	51	55	68	76
127	29	38	49	n.b.	n.b.
128	23	26	45	45	n.b.
129	25	37	61	66	89
130	40	43	70	80	64
131	19	27	33	49	n.b.
132	29	39	56	57	n.b.
133	39	45	53	66	n.b.
134	35	44	55	n.b.	n.b.
135	17	30	51	65	n.b.
136	22	26	43	42	n.b.
137	33	39	51	46	52
138	23	27	31	45	51
139	26	26	46	40	32
140	20	29	38	47	n.b.
141	25	34	40	42	n.b.
142	13	20	23	n.b.	n.b.
143	26	34	42	48	57
144	22	35	48	46	n.b.
145	19	27	n.b.	n.b.	n.b.
146	16	28	42	37	44
147	20	28	42	43	41
148	23	24	27	44	31
149	19	24	43	45	n.b.
150	30	29	56	n.b.	58
<b>pTRV2</b>					
1	23	36	40	n.b.	n.b.
2	34	42	n.b.	n.b.	n.b.
3	33	50	60	61	n.b.
4	20	21	37	43	n.b.
5	32	51	53	53	58
6	26	34	56	54	67
7	26	34	59	71	61
8	19	23	37	41	41
9	20	32	49	49	34
10	n.b.	30	43	47	n.b.
11	n.b.	37	62	54	65
12	22	30	46	54	n.b.
13	n.b.	32	40	62	n.b.
14	11	19	28	31	n.b.
15	18	24	44	n.b.	n.b.
16	23	39	52	43	34
17	28	37	71	76	50



Anhang Tab. 2: Fortsetzung

<b>pTRV2</b>						
18	37	46	63	60	58	
19	26	34	44	44	38	
20	26	27	47	46	36	
21	n.b.	33	45	53	n.b.	
22	22	27	36	44	29	
23	25	36	44	43	n.b.	
24	22	26	32	38	n.b.	
25	17	25	32	28	38	
26	19	22	34	40	n.b.	
27	42	50	74	69	72	
28	54	52	84	67	69	
29	39	49	81	86	62	
30	28	47	62	53	68	
<b>pTRV-EcFLO</b>						
31	23	36	39	34	43	
32	30	38	61	44	65	
33	17	17	25	40	n.b.	
34	17	29	37	41	29	
35	27	33	46	43	46	
36	22	25	36	45	n.b.	
37	22	40	51	38	39	
38	20	28	35	38	45	
39	23	23	43	52	n.b.	
40	26	41	52	54	62	
41	28	29	20	32	45	
42	37	37	51	56	44	
43	17	27	35	44	n.b.	
44	30	43	65	66	71	
45	17	32	40	38	36	
46	25	33	47	51	n.b.	
47	30	38	52	62	61	
48	24	n.b.	47	58	n.b.	
49	30	42	49	55	69	
50	30	40	59	61	n.b.	
51	30	34	54	61	62	
52	27	30	40	43	n.b.	
53	32	37	53	76	84	
54	22	26	39	37	50	
55	23	35	41	41	47	
56	13	27	33	24	41	
57	22	25	47	68	53	
58	21	31	32	25	30	
59	22	26	32	28	43	
60	20	31	35	49	n.b.	
<b>pTRV-EcKNOX</b>						
61	26	41	45	53	34	
62	39	45	55	31	40	
63	30	42	55	49	29	
64	21	27	42	41	32	
65	13	19	28	42	n.b.	
66	20	36	40	51	35	
67	24	28	44	40	47	
68	32	34	39	67	34	

Anhang Tab. 2: Fortsetzung

<b>pTRV-EcKNOX</b>					
69	13	25	29	24	n.b.
70	21	27	42	41	43
71	n.b.	46	62	59	n.b.
72	25	36	49	61	n.b.
73	38	40	65	60	n.b.
74	25	40	42	44	36
75	54	69	70	65	56
76	22	26	34	32	32
77	40	48	59	59	42
78	23	24	39	34	37
79	18	25	26	30	42
80	14	28	32	41	n.b.
81	21	33	41	32	36
82	18	26	29	35	n.b.
83	19	32	42	40	37
84	23	33	n.b.	n.b.	n.b.
85	19	28	42	45	45
86	17	18	34	35	40
87	19	31	34	39	n.b.
88	19	27	30	37	27
89	16	23	32	n.b.	n.b.
90	24	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<b>pTRVEcFLO+EcKNOX</b>					
151	17	25	40	42	37
152	24	31	43	39	29
153	17	23	37	36	31
154	19	20	26	29	n.b.
155	29	56	56	49	42
156	39	57	69	85	84
157	20	32	35	28	n.b.
158	20	25	31	37	n.b.
159	25	31	45	61	n.b.
160	34	62	67	74	n.b.
161	32	48	59	52	n.b.
162	17	27	36	23	n.b.
163	40	50	54	53	n.b.
164	18	20	35	40	n.b.
165	19	24	25	29	n.b.