

Einfluss von Cytokinin auf die Organgröße und auf Entwicklungsübergänge in *Arabidopsis thaliana*

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

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

vorgelegt von

Sören Werner

aus Berlin

2016

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2010 bis Oktober 2016 am Institut für Biologie/Angewandte Genetik der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Schmülling angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schuster

Disputation am: 07.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xii
1. Einleitung	1
1.1. Cytokinine	1
1.1.1. Der Cytokininmetabolismus.....	1
1.1.2. Cytokininsignaltransduktion	5
1.1.3. Cytokinindefizienz und -überschuss	8
1.2. Determination der Größe eines pflanzlichen Organs.....	12
1.2.1. Das Sprossapikalmeristem (SAM)	12
1.2.2. Organentwicklung und -wachstum.....	12
1.2.3. Die Rolle der Epidermis bei der Organentwicklung.....	18
1.3. Entwicklungsübergänge.....	19
1.3.1. Biogenese und Wirkungsmechanismus pflanzlicher miRNAs.....	22
1.3.2. Der miR156-abhängige, autonome Signalweg (<i>age pathway</i>)	24
1.3.3. Verbindungen zwischen Cytokinin und dem <i>age pathway</i>	29
1.4. Vorarbeiten und Zielsetzung	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Material	31
2.1.1. Internetressourcen und Software.....	31
2.1.2. Analysesets (Kits)	31
2.1.3. Enzyme.....	32
2.1.4. Chemikalien und Oligonukleotide.....	33
2.1.5. Nährmedien, Antibiotika, Herbizide und Aminosäuren	33
2.1.6. Mikroorganismen.....	35
2.1.7. Vektoren	36
2.1.8. Pflanzenmaterial	39
2.2. Methoden.....	41
2.2.1. Arbeiten mit Bakterien	41
2.2.2. Arbeiten mit Hefe	44
2.2.3. Arbeiten mit Pflanzen	46
2.2.4. Molekularbiologische Arbeiten.....	52
2.2.5. Messung physiologischer Parameter.....	62

3. Ergebnisse.....	64
3.1. Phänotypische und molekularbiologische Analyse von transgenen Pflanzen mit verändertem Cytokininstatus in der Epidermis.....	66
3.1.1. Überprüfung der Funktionalität der klonierten Gene	66
3.1.2. Auswahl eines geeigneten Epidermis-spezifischen Promotors	68
3.1.3. Die Expression von <i>pATML1:LOG4</i> , <i>pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc</i> und <i>pATML1:CKX1-4xMyc</i> wirkt sich auf den Cytokininstatus aus	74
3.1.4. Charakterisierung der <i>pATML1</i> -Linien	77
3.1.5. Die Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 und der Typ-B-Responseregulator ARR1 vermitteln das verstärkte Rosettenwachstum bei <i>pATML1:LOG4</i> -Pflanzen	87
3.1.6. Die Rolle der Epidermis bei der cytokininvermittelten Determination der Blattgröße.....	88
3.1.7. Die Veränderung des Cytokininstatus in der Epidermis beeinflusst den Übergang von juveniler zu adulter vegetativer Phase und den Blühzeitpunkt.....	92
3.2. Einfluss von Cytokinin auf Entwicklungsübergänge (Transitionen).....	94
3.2.1. Der Cytokininstatus korreliert negativ mit der Länge der juvenilen vegetativen Phase und positiv mit dem Blühzeitpunkt.....	95
3.2.2. Die Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 und der Typ-B-Responseregulator ARR1 sind an der Regulation von Entwicklungsübergängen beteiligt	98
3.2.3. Cytokinin beeinflusst die Expression von Komponenten des miR156-abhängigen autonomen Signalwegs.....	100
3.2.4. Der Gibberellengehalt ist in cytokinindefizienten Pflanzen erhöht.....	105
3.2.5. Cytokinin induziert die Expression von miR172.....	108
3.2.6. ARR1, ARR2 und ARR12 binden in einem <i>Yeast-one-hybrid</i> -Matrixansatz an <i>MIR172</i> -Promotoren.....	111
3.2.7. Genetische Untersuchung der Interaktion der Cytokinin-Signalkaskade mit dem miR156-abhängigen autonomen Signalweg.....	114
4. Diskussion.....	127
4.1. Charakterisierung von transgenen Pflanzen mit verändertem Cytokininstatus in der Epidermis	127
4.1.1. Die Expression von <i>pATML1:LOG4</i> , <i>pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc</i> und <i>pATML1:CKX1-4xMyc</i> wirkt sich auf den Cytokininstatus aus	127
4.1.2. Die epidermale Expression von <i>LOG4</i> , <i>ARR1-SRDX</i> und <i>CKX1</i> beeinflusst das Sprosswachstum	129
4.1.3. Auswirkungen der <i>pATML1</i> -gesteuerten <i>LOG4</i> - und <i>CKX1</i> -Expression auf das Wurzelwachstum	141
4.2. Einfluss von Cytokinin auf Entwicklungsübergänge (Transitionen).....	143
4.2.1. Der Cytokininstatus korreliert negativ mit der Länge der juvenilen vegetativen Phase	144

4.2.2. Cytokinin beeinflusst die Blühinduktion durch Regulation der Länge der juvenilen Phase und der Blattbildungsrate	146
4.2.3. Cytokinin beeinflusst die Expression von Komponenten des miR156-abhängigen Signalwegs	148
4.2.4. Genetische Untersuchung der Interaktion der Cytokinin-Signalkaskade mit dem miR156-abhängigen autonomen Signalweg.....	156
4.2.5. Die Erhöhung des Gibberellin Gehalts und der Expression von <i>SPL</i> -Genen der <i>SPL3</i> -Gruppe in cytokinindefizienten Pflanzen stellt möglicherweise einen Kompensationsmechanismus dar	159
4.2.6. Modell und Ausblick	161
5. Zusammenfassung.....	163
6. Summary.....	165
Literaturverzeichnis.....	167
Anhang	I
Unterstützende Daten.....	I
Oligonukleotide	V
Vektorkarten	IX
Danksagung	XI

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1:</i> Cytokininbiosynthese und -signaltransduktion.....	3
<i>Abb. 2:</i> Faktoren und Signalwege, die die Blattentwicklung und Blattgröße beeinflussen	16
<i>Abb. 3:</i> Vereinfachtes Modell der fünf Hauptsignalwege, die in <i>Arabidopsis</i> die Blühinduktion steuern.	20
<i>Abb. 4:</i> Die miRNA-Biogenese und der <i>age pathway</i>	23
<i>Abb. 5:</i> Schematische Darstellung der qRT-basierten Quantifizierungsmethode für reife microRNAs.....	60
<i>Abb. 6:</i> Überprüfung der Funktionalität der klonierten Gene.....	68
<i>Abb. 7:</i> Promotoraktivität von <i>pATML1</i> im Spross	69
<i>Abb. 8:</i> Die ektopische Expression von <i>LOG4</i> und <i>CKX1</i> unter der Kontrolle des Promotors <i>pATML1</i> beeinflusst Rosettengröße und Blühzeitpunkt.....	70
<i>Abb. 9:</i> Die Expression von <i>ARR1-SRDX</i> unter der Kontrolle des Promotors <i>pATML1</i> hat nur geringe Auswirkungen auf das Sprosswachstum	71
<i>Abb. 10:</i> Die ektopische Expression von <i>LOG4</i> und <i>CKX1</i> unter der Kontrolle der Promotoren <i>pMIR165A</i> und <i>pPDF1</i> hat nur geringe Auswirkungen auf das Sprosswachstum.....	73
<i>Abb. 11:</i> Auswirkungen der Expression von <i>pATML1:LOG4</i> und <i>pATML1:CKX1-4xMyc</i> auf den Cytokiningehalt.....	75
<i>Abb. 12:</i> Auswirkungen der Transgenexpression in <i>pATML1</i> -Linien auf die Transkriptabundanz von <i>ARR4</i> und <i>ARR6</i>	76
<i>Abb. 13:</i> Promotoraktivität von <i>pATML1</i> in der Wurzel.....	77
<i>Abb. 14:</i> AL-Pflanzen bilden längere Primärwurzeln und eine höhere Zahl an Seitenwurzeln bei gleicher Dichte	78
<i>Abb. 15:</i> AC-Pflanzen bilden längere Primärwurzeln und eine höhere Zahl an Seitenwurzeln bei verringertem Abstand und sind bei der Seitenwurzelbildung weniger sensitiv gegenüber exogen appliziertem Cytokinin	79
<i>Abb. 16:</i> Die Transgenexpression in <i>pATML1:LOG4</i> und <i>pATML1:CKX1-4xMyc</i> wirkt sich auf die Größe des Sprossapikalmeristems aus.....	80
<i>Abb. 17:</i> Plastochronindex der AL-, AAS- und AC-Linien im Vergleich zum Wildtyp.....	81
<i>Abb. 18:</i> Rosettenwachstum der <i>pATML1</i> -Linien.....	81
<i>Abb. 19:</i> Analyse der abaxialen Epidermis des siebten Rosettenblattes der <i>pATML1</i> -Linien.....	83
<i>Abb. 20:</i> Die Veränderung des Cytokininstatus in den <i>pATML1</i> -Linien beeinflusst die Dicke des Stengels	84
<i>Abb. 21:</i> Sprosswachstum in der reproduktiven Phase und Schotenproduktion	85
<i>Abb. 22:</i> Die Expression von <i>pATML1:LOG4</i> und <i>pATML1:CKX1-4xMyc</i> wirkt sich auf den Samenertrag aus	86
<i>Abb. 23:</i> Blüten und Gynoeceen der <i>pATML1</i> -Linien	87
<i>Abb. 24:</i> Die Cytokininrezeptoren <i>AHK2</i> und <i>AHK3</i> vermitteln das verstärkte Rosettenwachstum bei <i>pATML1:LOG4</i> -Pflanzen	89
<i>Abb. 25:</i> Der Typ-B-Responseregulator <i>ARR1</i> ist an der Vermittlung des verstärkten Rosettenwachstums bei <i>pATML1:LOG4</i> -Pflanzen beteiligt	90

<i>Abb. 26:</i> Doppelt transgene AL AAS-Pflanzen machen eine Cytokinin- und Epidermis-abhängige Regulation des Rosettenwachstums deutlich	91
<i>Abb. 27:</i> Cytokinin-defiziente Pflanzen zeigen keine Cafenstrol-induzierte Vergrößerung der Blattrosette	92
<i>Abb. 28:</i> Blühbeginn der <i>pATML1</i> -Linien und der doppelt transgenen AL AAS-Pflanzen	93
<i>Abb. 29:</i> Der veränderte Cytokininstatus der <i>pATML1</i> -Linien wirkt sich auf den Übergang von juveniler zu adulter vegetativer Entwicklungsphase aus.....	94
<i>Abb. 30:</i> Der Cytokininstatus in der Pflanze wirkt sich auf die Länge der juvenilen vegetativen Phase aus	96
<i>Abb. 31:</i> Der Cytokininstatus der Pflanze beeinflusst den Blühbeginn.....	97
<i>Abb. 32:</i> Plastochronindex verschiedener Pflanzenlinien mit verändertem Cytokininstatus.....	98
<i>Abb. 33:</i> Auswirkungen der <i>pATML1:LOG4</i> -Expression auf die Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter in den Doppelmutanten <i>arr1 arr10</i> , <i>arr1 arr12</i> und <i>arr10 arr12</i>	99
<i>Abb. 34:</i> Expression von pri-miR156a und pri-miR172b in Cytokinin-defizienten Pflanzen	101
<i>Abb. 35:</i> Expression von Zielgenen der microRNAs miR156 und miR172 in Cytokinin-defizienten Pflanzen	102
<i>Abb. 36:</i> Der verringerte Cytokininstatus in <i>pATML1:CKX1-4xMyc</i> bewirkt eine Reduktion des Levels an reifer miR172.....	103
<i>Abb. 37:</i> Der verringerte Cytokininstatus in <i>pATML1:CKX1-4xMyc</i> hat Auswirkungen auf die Expression der Zielgene von miR156 und miR172	104
<i>Abb. 38:</i> Der verringerte Cytokininstatus in <i>pATML1:CKX1-4xMyc</i> hat Auswirkungen auf die Expression von Genen des Gibberellinmetabolismus	105
<i>Abb. 39:</i> Einfluss des Cytokininstatus auf den Gibberellin Gehalt im Spross	107
<i>Abb. 40:</i> Cytokinin induziert die Expression von miR172.....	109
<i>Abb. 41:</i> Die Expression von miR156- und miR172-Zielgenen steht nicht unter direkter Cytokininkontrolle	110
<i>Abb. 42:</i> Überprüfung auf das Vorhandensein des <i>Cytokinin Response Motif</i> (CRM) bzw. des erweiterten CRM (ECRM) in den proximalen Promotoren der <i>MIR172</i> -Gene.....	112
<i>Abb. 43:</i> Typ-B-ARRs interagieren in einem <i>Yeast-one-hybrid</i> -Matrixansatz mit <i>MIR172</i> -Promotorfragmente	113
<i>Abb. 44:</i> Die <i>rock2</i> -Mutation revertiert partiell die verlängerte juvenile Phase und den verspäteten Blühbeginn der <i>spl9 spl15</i> -Doppelmutante	115
<i>Abb. 45:</i> Der Verlust von AHK2 und AHK3 führt zu einer zusätzlichen Verlängerung der juvenilen Phase von <i>spl9 spl15</i> , während sich die adulte Phase verkürzt	116
<i>Abb. 46:</i> <i>Rock2 rSPL9</i> ähnelt <i>rSPL9</i> , blüht aber früher	117
<i>Abb. 47:</i> <i>Ahk2 ahk3 rSPL9</i> ähnelt <i>rSPL9</i> , blüht aber später.....	118
<i>Abb. 48:</i> <i>Rock2 toe3</i> hat eine verkürzte Juvenil- und Adultphase, blüht früher und ähnelt dabei <i>rock2</i> -Pflanzen.....	119
<i>Abb. 49:</i> <i>Ahk2 ahk3 toe3</i> ähnelt hinsichtlich der Juvenil- und der Adultphase sowie des Blühzeitpunktes am ehesten der <i>toe3</i> -Mutante.....	120
<i>Abb. 50:</i> Nachweis des SMZ-Genverlustes in einer bisher unbeschriebenen <i>smz</i> -Mutante	121

Abb. 51: Die Juvenil- und die Adultphase von *rock2 smz*-Pflanzen ist jeweils in ähnlicher Weise verkürzt wie bei *rock2*-Pflanzen 122

Abb. 52: *Ahk2 ahk3 smz*-Pflanzen ähneln mit einer verlängerten juvenilen und einer verkürzten adulten Phase der *ahk2 ahk3*-Doppelmutante 123

Abb. 53: MIM156- und MIM172-Kreuzungen mit *rock2* und *ahk2 ahk3* 125

Abb. 54: Der Genverlust von *AHK2* und *AHK3* führt zu einer partiellen Wiederherstellung der juvenilen Phase in MIM156-Pflanzen..... 126

Abb. 55: Modell der Interaktion der Cytokininsignalkaskade mit dem *age pathway*..... 162

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Computerprogramme und Internetressourcen.	31
Tab. 2: Verwendete Kits.	32
Tab. 3: Verwendete Enzyme.	32
Tab. 4: Nährmedien für Bakterien.....	33
Tab. 5: Verwendete Antibiotika für die Selektion von Bakterien und deren Konzentration im Medium.	34
Tab. 6: Nährmedien für Hefen.	34
Tab. 7: Verwendete Aminosäuren und deren Konzentration im SD-Medium.....	34
Tab. 8: Nährmedien für Pflanzen.	35
Tab. 9: Verwendete Antibiotika und Herbizide für die Selektion von <i>Arabidopsis-thaliana</i> -Pflanzen und deren Konzentration im Pflanzenmedium.	35
Tab. 10: Verwendete Bakterien- und Hefestämme.	36
Tab. 11: Verwendete Plasmide.	37
Tab. 12: In dieser Arbeit generierte Plasmide.....	38
Tab. 13: Verwendete Mutanten und transgene Linien.....	39
Tab. 14: In dieser Arbeit generierte Pflanzenlinien.....	40
Tab. 15: Zusammensetzung des PCR-Standardansatzes.....	55
Tab. 16: Standard-PCR-Programm.	55
Tab. 17: Zusammensetzung des Phusion-PCR-Ansatzes.....	55
Tab. 18: Phusion-PCR-Programm.....	56
Tab. 19: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für den Nachweis der <i>rock2</i> - und <i>rock3</i> -Punktmutationen	56
Tab. 20: PCR-Programm für den Nachweis der <i>rock2</i> - und <i>rock3</i> -Punktmutationen.....	57
Tab. 21: Sequenzen der Gateway®- <i>attachment-sites</i> für die Klonierung von DNA-Fragmenten in die entsprechenden DONR™-Vektoren.....	59
Tab. 22: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.	59
Tab. 23: Reaktionsansatz für die <i>Stem-loop</i> -cDNA-Synthese.....	60
Tab. 24: Reaktionsansatz für qRT-Analysen.	61
Tab. 25: qRT-PCR-Programm.....	61
Tab. 26: Klonierte Promotoren und ihre Expressionsdomänen.....	64
Tab. 27: Cytokiningehalt in pATML1:LOG4, Col-0 und pATML1:CKX1-4xMyc.	74
Tab. 28: Gibberellengehalt in <i>rock2</i> , pATML1:LOG4, Col-0, <i>ahk2 ahk3</i> und pATML1:CKX1-4xMyc.	106

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
°C	Grad Celsius	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μM	Mikromolar	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
A	Adenin	min	Minute(n)
Abb.	Abbildung	ml	Milliliter
ADP	Adenosindiphosphat	mM	Millimolar
AMP	Adenosinmonophosphat	MnCl ₂	Manganchlorid
ATP	Adenosintriphosphat	mRNA	<i>Messenger</i> -RNA
att	engl. <i>attachment site</i>	ms	Millisekunde(n)
bp	Basenpaare	N	Normalität
bzw.	beziehungsweise	Na ₂ MoO ₄	Natriummolybdat
C	Cytosin	NaCl	Natriumchlorid
Ca(NO ₃) ₂	Calciumnitrat	NaOH	Natriumhydroxid
CaCl ₂	Calciumchlorid	nm	Nanometer
CAPS	engl. <i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)	p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei statistischen Tests bzw. Plasmid bzw. Promotor
CoCl ₂	Cobaltchlorid	PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Col-0	Columbia-0	PEG	Polyethylenglykol
Ct	<i>cycle of threshold</i>	PIPES	1,4-Piperazindiethylsulfonsäure
CuSO ₄	Kupfersulfat	R	Resistenz
dCAPS	engl. <i>derived cleaved amplified polymorphic sequence</i>	rev	engl. <i>reverse</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNase	Ribonuklease
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)	rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
DNase	Desoxyribonuklease	rRNA	ribosomale RNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	RT	Raumtemperatur
DTT	1,4-Dithiothreitol	RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
EDTA	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylenediamintetraessigsäure)	s.	siehe
EMS	Ethylmethansulfonat	SD	engl. <i>short day</i> (Kurztag)
engl.	englisch	SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
F	Filialgeneration	sec	engl. <i>second(s)</i> (Sekunde[n])
Fe-EDTA	engl. <i>ferric ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Eisen-Ethylenediamintetraessigsäure)	sog.	sogenannte(n/r/s)
for	engl. <i>forward</i>	T	Thymin
g	Gramm bzw. x-fache Erdbeschleunigung	T1-T4	Transformantengenerationen (T1 = Primärtransformant)
G	Guanin	Tab.	Tabelle
GFP	grünfluoreszierendes Protein	T-DNA	Transfer-DNA
GUS	β-Glukuronidase	TNK	Tage nach Keimung
h	engl. <i>hour(s)</i> (Stunde[n])	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
H ₃ BO ₃	Borsäure	tRNA	Transfer-RNA
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)	U	engl. <i>units</i> (Einheiten)
ID	Identifikation	u. a.	unter anderem
kb(p)	Kilobasen(paare)	UGT	Uridindiphosphatglycosyltransferase
KCl	Kaliumchlorid	UTR	untranslatierte Region
KNO ₃	Kaliumnitrat	vgl.	vergleiche
KOH	Kaliumhydroxid	w/	engl. <i>with</i> (mit)
KPO ₄	Kaliumphosphat	w/o	engl. <i>without</i> (ohne)
L1, L2, L3	klonale Meristemschicht 1-3	z. B.	zum Beispiel
LD	engl. <i>long day</i> (Langtag)	z. T.	zum Teil
M	Molar	ZnSO ₄	Zinksulfat

1. Einleitung

1.1. Cytokinine

Cytokinine sind Phytohormone, die ursprünglich aufgrund ihrer Fähigkeit, die Zellteilung und Organogenese in Embryo- und Kalluskulturen anzuregen, entdeckt wurden (Van Overbeek *et al.*, 1941; Miller *et al.*, 1955). Seither wurde eine Vielzahl an Cytokininen aus diversen Pflanzenspezies isoliert und auf ihre biologischen Aktivitäten hin untersucht (Mok & Mok, 2001). Bis heute wurden zahlreiche Aspekte der pflanzlichen Entwicklung aufgedeckt, bei denen Cytokinine eine prominente Rolle spielen, dazu gehören Entwicklung und Wachstum von Spross- und Wurzelorganen, Photomorphogenese, Apikaldominanz, Phyllotaxis, Nährstoffaufnahme, *sink-source*-Beziehungen und Blattseneszenz (Werner & Schmülling, 2009; Hwang *et al.*, 2012; Kieber & Schaller, 2014). Außerdem übernehmen Cytokinine wichtige Funktionen bei der pflanzlichen Interaktion mit biotischen und abiotischen Faktoren (Ha *et al.*, 2012; O'Brien & Benková, 2013; Zwack & Rashotte, 2015). Viele der von Cytokininen beeinflussten Prozesse werden im Zusammenspiel mit anderen Phytohormonen kontrolliert, vor allem Auxin (Vanstraelen & Benková, 2012; O'Brien & Benková, 2013; Schaller *et al.*, 2015; Shigenaga & Argueso, 2016).

Chemisch gesehen sind Cytokinine eine Gruppe natürlich vorkommender N^6 -substituierter Adeninderivate. Am häufigsten sind Cytokinine mit Isoprenoid-Seitenketten, es existieren aber auch Cytokinine mit aromatischen Substituenten. Weit verbreitete bioaktive Cytokinine des Isoprenoidtyps sind N^6 -Isopentenyladenin (iP), *trans*-Zeatin (*tZ*), *cis*-Zeatin (*cZ*) und Dihydrozeatin (DHZ), wobei die Abundanz und Wichtigkeit dieser Formen nicht nur von der Pflanzenspezies, sondern auch vom Gewebe und Entwicklungsstadium abhängen. In *Arabidopsis* stellen iP- und *tZ*-Formen den Großteil der Cytokinine, in anderen Pflanzenspezies wie Kichererbse, Mais und Reis konnten aber auch große Anteile von *cZ*-Metaboliten nachgewiesen werden (Sakakibara, 2006). Im Gegensatz zu *tZ* zeigen *cZ* und DHZ nur geringe Cytokininaktivität (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006; Heyl *et al.*, 2012) und über ihre Funktionen in der Pflanze gibt es bisher nur wenige Informationen. Aromatische Cytokinine wurden zwar in diversen Pflanzenspezies nachgewiesen und zeigen eine starke Aktivität (z. B. Benzyladenin), allerdings ist über ihre Biosynthese- und Abbauege sowie ihre biologische Relevanz bisher nur wenig bekannt (Sakakibara, 2006; Werner *et al.*, 2006; Plíhalová *et al.*, 2016).

1.1.1. Der Cytokininmetabolismus

Die bioaktiven Cytokininformen machen in der Pflanze nur einen geringen Anteil der Cytokiningesamtmenge aus, in *Arabidopsis* liegt die endogene Konzentration der freien Basen bei etwa 0,7-2,5 nM (Kieber & Schaller, 2014). Die entsprechenden Nukleotide, Riboside und Glucoside stellen den Großteil

der pflanzlichen Cytokininmetabolite dar. Neben der metabolischen Umwandlung und Modifizierung wird die Cytokininhomeostase auch durch *de-novo*-Synthese und durch Abbauprozesse reguliert.

1.1.1.1. Die Cytokininbiosynthese

Bislang sind zwei Wege der Cytokininbiosynthese bekannt, die beide auf der *N*-Prenylierung eines Adeninrestes basieren. Als Substrate für die Reaktion dienen entweder tRNAs oder Adenosin-5'-phosphate (AMP, ADP oder ATP). In *Arabidopsis* fungiert vor allem Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) als Prenyldonor, das über den Mevalonatweg (MVA-Weg) im Cytosol oder den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) in den Plastiden bereitgestellt wird, aber auch die Nutzung des MEP-Weg-Intermediates Hydroxymethylbutenyldiphosphat (HMBDP) wird diskutiert (Sakakibara, 2006).

Die Übertragung der Prenylgruppe auf die *N*⁶-Aminogruppe des Adeninrestes wird durch Isopentenyltransferasen (IPTs) katalysiert, welche in *Arabidopsis* eine Genfamilie aus neun Mitgliedern bilden (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001a). IPT2 und IPT9 sind tRNA-IPTs, deren Aktivität zur Bildung von *cZ* führt (Miyawaki *et al.*, 2006). Eine Umwandlung in die *trans*-Konfiguration findet kaum statt (Gajdošová *et al.*, 2011), sodass das in *Arabidopsis* vorherrschende *tZ* in erster Linie über den zweiten Weg (Abb. 1A) synthetisiert wird. Biochemische Studien legen nahe, dass pflanzliche IPTs hauptsächlich ADP oder ATP und kaum AMP als Prenylakzeptoren nutzen; die Aktivität von IPT1 und IPT3-8 führt also in erster Linie zur Bildung von Isopentenylribosid-5'-biphosphat und -triphosphat (iPRDP und iPRTP) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2003; Sakano *et al.*, 2004). Durch Hydroxylierung der Isoprenoidseitenkette durch die Cytochrom-P450-Monooxygenasen CYP735A1 und CYP735A2 entstehen die entsprechenden *tZ*-Nukleotide (Takei *et al.*, 2004a).

IPT1, IPT3, IPT5 und IPT8 sind im Chloroplasten lokalisiert, was darauf hindeutet, dass ein Großteil der Cytokininbiosynthese in Plastiden stattfindet und die übertragene Isopentenylgruppe in erster Linie aus dem MEP-Weg stammt (Kasahara *et al.*, 2004). In Abhängigkeit einer Farnesylierung kann IPT3 auch im Cytosol oder im Kern vorkommen (Galichet *et al.*, 2008). IPT2 und IPT4 sind im Cytosol lokalisiert, IPT7 in den Mitochondrien (Kasahara *et al.*, 2004).

In *Arabidopsis* ermöglichen die gewebe- und organspezifischen Expressionsmuster der *IPT*-Gene die Cytokininproduktion fast überall in der Pflanze (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004b). Von den ATP/ADP-IPTs, die den Großteil der pflanzlichen Cytokininmetabolite produzieren, sind während der vegetativen Phase vor allem *IPT1*, *IPT3*, *IPT5* und *IPT7* exprimiert, während *IPT4*, *IPT6* und *IPT8* in erster Linie in reproduktiven Organen aktiv sind (Miyawaki *et al.*, 2004). Die Untersuchung von Doppel- und Mehrfachmutanten ließ eine starke funktionelle Redundanz der *IPT*-Gene erkennen. Starke phänotypische Auswirkungen konnten nur bei Mehrfachmutanten beobachtet werden, in denen mindestens

die *IPT*-Gene *IPT3*, *IPT5* und *IPT7* ausgeschaltet sind, was ein verringertes Spross- und ein verstärktes Wurzelwachstum zur Folge hat (Miyawaki *et al.*, 2006).

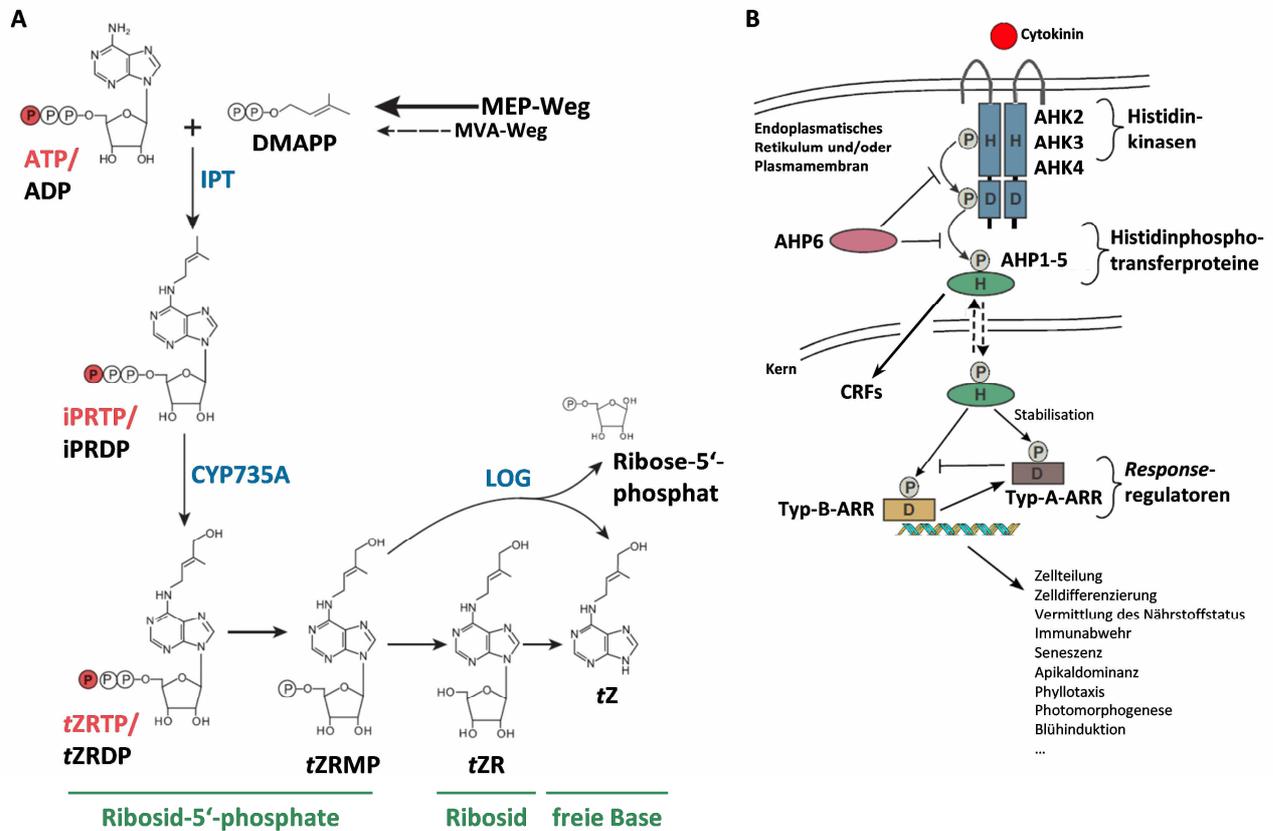


Abb. 1: Cytokininbiosynthese und -signaltransduktion. (A) Vereinfachte Darstellung der Biosynthese von iP- und tZ-Cytokininen; Beschreibung s. Text; modifiziert nach Kieber & Schaller (2014). **(B)** Schematische Darstellung der Cytokininsignaltransduktion in *Arabidopsis*; Beschreibung s. Text; modifiziert nach El-Showk *et al.* (2013).
 Abkürzungen: ADP/ATP = Adenosin-5'-diphosphat/-triphosphat, D = Aspartatrest, DMAPP = Dimethylallyldiphosphat, IPT = Isopentenyltransferase, iP-/tZRDP = Isopentenyl-/trans-Zeatinribosid-5'-biphosphat, iP-/tZRTP = iP-/tZ-ribosid-5'-triphosphat, H = Histidinrest, MEP = Methylerythritolphosphat, MVA = Mevalonat, P = Phosphorylgruppe.

Die biologisch aktiven Cytokininnukleobasen entstehen durch die Aktivität der LONELY-GUY (LOG)-Enzyme, Phosphoribohydrolasen, die in einem einzigen Schritt die Phosphoribose der Ribosid-5'-monophosphate (RMPs) entfernen (Kurakawa *et al.*, 2007; Kuroha *et al.*, 2009; Tokunaga *et al.*, 2012). Da die LOG-Enzyme nur RMPs als Substrat nutzen können (Kurakawa *et al.*, 2007), werden die RDPs und RTPs wahrscheinlich zunächst von Phosphatasen dephosphoryliert (Frébort *et al.*, 2011). In *Arabidopsis* kodieren sieben Gene (*LOG1-LOG5*, *LOG7* und *LOG8*) für funktionelle Proteine, die alle im Cytosol und im Kern lokalisiert sind. Hinsichtlich der Isoprenoidcytokinine zeigen die LOG-Enzyme die höchste Substrataffinität zu DHZ-RMP, gefolgt von iP-RMP, tZ-RMP und cZ-RMP (Kuroha *et al.*, 2009). Die z. T. spezifischen, z. T. überlappenden Expressionsdomänen der *LOG*-Gene gewährleisten eine ubiquitäre Aktivität der Enzyme in der Pflanze (Kuroha *et al.*, 2009). Der Ausfall mehrerer *LOG*-Gene

führt zu schwerwiegenden Wachstumsdefekten von Spross und Wurzel, die wahrscheinlich auf die stark verkleinerten Apikalmeristeme zurückzuführen sind (Tokunaga *et al.*, 2012). *LOG4* und *LOG7* sind im Sprossapikalmeristem (SAM) und in reproduktiven Meristemen exprimiert, wobei *LOG4* in der L1-Schicht und *LOG7* in einer begrenzten Region im oberen Teil des Meristems sowie in sich entwickelnden Primordien aktiv ist (Yadav *et al.*, 2009; Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016).

1.1.1.2. Der Cytokininabbau

Der Cytokininabbau erfolgt durch Cytokininoxidasen/-dehydrogenasen (CKX), die die irreversible Abspaltung der Isoprenoidseitenkette vom Adeninring katalysieren, sodass ein Adenin bzw. Adenosin und das Seitenkettenaldehyd entstehen (Brownlee *et al.*, 1975; McGaw & Horgan, 1983). Die CKX-Enzyme sind Oxidoreduktasen, die als Co-Faktor ein kovalent gebundenes Flavinadenindinukleotid (FAD) nutzen (Bilyeu *et al.*, 2001).

Das *Arabidopsis*-Genom enthält sieben *CKX*-Gene, die während verschiedener Entwicklungsstadien und vor allem in teilungsaktiven Geweben aktiv sind (Bilyeu *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003). *CKX*-Gene sind unter anderem im Sprossapex und lateralen Sprossmeristemen, während der Entwicklung von Blättern, Blüten, Spaltöffnungen und Wurzeln, im Vaskulargewebe von Spross und Wurzel und in Trichomen junger Blätter exprimiert (Werner *et al.*, 2003; Köllmer *et al.*, 2014). Die Expressionsstärke der *CKX*-Gene ist insgesamt niedrig (Werner *et al.*, 2006), allerdings werden mehrere von ihnen nach Cytokininbehandlung stark induziert (Brenner *et al.*, 2012; Bhargava *et al.*, 2013). Die Expressionsdomänen der einzelnen *CKX*-Gene sind klein und überlappen in vielen teilungsaktiven Regionen mit jenen der *IPT*-Gene, was auf lokal begrenzte, para- oder autokrine Cytokininaktivitäten hindeutet (Werner *et al.*, 2006). Die Expression von *CKX6* und *IPT3* im Leitgewebe spricht allerdings auch für die Regulation einer endokrinen Funktionsweise des Hormons (Werner *et al.*, 2003; Miyawaki *et al.*, 2004).

Die verschiedenen CKX-Enzyme unterscheiden sich nicht nur in ihren Expressionsmustern, sondern auch in ihrer subzellulären Lokalisation, Aktivität und Substratspezifität. CKX1 und CKX3 sind in der Vakuole lokalisiert (Werner *et al.*, 2003), CKX7 im Cytosol (Köllmer *et al.*, 2014). Alle übrigen Isoformen sind laut bioinformatischer Analysen oder Lokalisationsstudien mit GFP-Fusionsproteinen in verschiedenen Kompartimenten des sekretorischen *pathways* lokalisiert (Werner *et al.*, 2003; Köllmer *et al.*, 2014). Die CKX-Enzyme zeigen die höchste Affinität gegenüber Cytokinin mit einer Isoprenoidseitenkette, vor allem *iP*, *tZ* und ihren jeweiligen Ribosidformen, aber auch Cytokininglucoside und -nukleotide werden von einigen CKX-Enzymen bevorzugt (Galuszka *et al.*, 2007; Kowalska *et al.*, 2010). Die Substrataffinitäten und Aktivitätsmaxima sind zudem pH-Wert-abhängig, was die Lokalisation der verschiedenen CKX-Isoformen in unterschiedlichen Zellkompartimenten widerspiegelt (Werner *et al.*, 2006).

1.1.1.3. Cytokinin-Inaktivierung durch Konjugation

Der Gehalt an bioaktiven Cytokininen in der Pflanze kann nicht nur durch CKX-Aktivität vermindert werden. Darüber hinaus existiert noch ein weiterer Mechanismus, bei dem Cytokinine durch Verknüpfung mit einem Glucosemolekül inaktiviert werden.

In *Arabidopsis* wurden fünf Cytokininglucosyltransferasen identifiziert (Hou *et al.*, 2004). Interessanterweise hat die Überexpression entsprechender Gene keine Auswirkungen auf den Gehalt der bioaktiven Cytokininbasen, was deutlich macht, dass die Pflanzen über hohe Kapazitäten verfügen, solch drastischen metabolischen Veränderungen entgegenzuwirken und die Cytokininfunktionen damit auf einem gleichbleibenden Level zu halten (Wang *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013a).

UGT76C1 und UGT76C2 modifizieren das N^7 - und N^9 -Atom, nicht aber die N^3 -Position des Purinringes der meisten Cytokinine (*N*-Glucosylierung) (Hou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011). N^3 -Glucoside konnten zwar ebenfalls nachgewiesen werden (Letham *et al.*, 1975), entsprechende Enzyme konnten bisher aber nicht identifiziert werden. Cytokinin-*N*-Glucoside sind weitestgehend biologisch inaktiv und resistent gegenüber der Aktivität von β -Glucosidasen (Letham & Palni, 1983; Brzobohatý *et al.*, 1993; Spíchal *et al.*, 2004). Die *N*-Glucosylierung ist somit irreversibel und stellt daher wahrscheinlich einen Kompensierungsmechanismus dar, der die Menge an aktiven Cytokininformen reguliert (Wang *et al.*, 2013a).

O-Glucosylierungen erfolgen am Sauerstoffatom der Seitenketten von *cZ*, *tZ* sowie DHZ und werden in *Arabidopsis* von UGT85A1, UGT73C5 und UGT73C1 katalysiert (Sakakibara, 2006). *O*-Glucoside sind ebenfalls biologisch inaktiv (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006; Stolz *et al.*, 2011), können aber im Gegensatz zu den *N*-Glucosiden durch die Aktivität von β -Glucosidasen wieder in die entsprechenden bioaktiven Nucleobasen umgewandelt werden (Brzobohatý *et al.*, 1993). *O*-Glucosylierungen sind demnach reversible Modifikationen. Anders als die *N*-Glucoside können *O*-Glucoside zudem nicht durch CKX-Aktivität abgebaut werden (Galuszka *et al.*, 2007), weshalb davon ausgegangen wird, dass es sich bei *O*-Glucosiden um transiente, stabile Speicherformen handelt (Sakakibara, 2006).

1.1.2. Cytokininsignaltransduktion

Die Cytokininsignaltransduktion ist in Abb. 1B schematisch dargestellt. Die Perzeption des Cytokininsignals erfolgt in *Arabidopsis* über die drei membranständigen Rezeptorhistidinkinasen CRE1/AHK4, AHK2 und AHK3 (Hwang & Sheen, 2001; Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001). Die Rezeptorproteine sind vornehmlich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert, wobei die cytokininbindende CHASE-Domäne in Richtung des ER-Lumens orientiert ist (Caesar *et al.*, 2011; Lomin *et al.*, 2011; Wulfetange *et al.*, 2011). Die Cytokininbindung im ER-Lumen resultiert in einer Dimerisierung der Rezeptorproteine (Dortay *et al.*, 2008; Caesar *et al.*, 2011; Hothorn *et al.*, 2011), was zu einer Autophosphorylierung an einem Histidinrest in der auf der anderen Membranseite liegenden

Kinasedomäne führt. Die Phosphorylgruppe wird intramolekular auf einen Aspartatrest der Empfängerdomäne und von dort auf Histidinphosphotransferproteine (AHPs) übertragen (Hwang & Sheen, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004).

In *Arabidopsis* existieren sechs *AHP*-Gene, wobei *AHP6* für ein Pseudophosphotransferprotein kodiert, dem im Vergleich zu den anderen AHP-Proteinen der konservierte Histidinrest fehlt und bei dem es sich um einen negativen Regulator der Cytokininsignaltransduktion handelt (Hutchison *et al.*, 2006; Mähönen *et al.*, 2006; Bishopp *et al.*, 2011b). Die übrigen AHPs transferieren die Phosphorylgruppe im Zellkern auf die Empfängerdomäne von Typ-B-*Response*regulatoren (Typ-B-ARRs) (Hwang & Sheen, 2001; Tanaka *et al.*, 2004). Die aktivierten Typ-B-ARRs agieren als Transkriptionsfaktoren und induzieren die Transkription primärer Cytokininantwortgene, unter denen sich unter anderem Typ-A-ARR-Gene befinden (Sakai *et al.*, 2000; 2001; Brenner *et al.*, 2012; Bhargava *et al.*, 2013). ARR des A-Typs ähneln strukturell denen des B-Typs. So besitzen sie ebenfalls eine Empfängerdomäne, verfügen aber im Unterschied zu den Typ-B-ARRs nicht über eine DNA-Bindedomäne. Demnach konkurrieren sie mit den Typ-B-ARRs um die Phosphorylgruppen der AHPs und bewirken auf diese Weise eine Hemmung der Cytokininsignaltransduktion (Kieber & Schaller, 2014).

Im *Arabidopsis*-Genom wurden elf Typ-B-ARR-Gene (*ARR1*, *ARR2*, *ARR10-14*, *ARR18-21*) und zehn Typ-A-ARR-Gene (*ARR3-9*, *ARR15-17*) identifiziert (D'Agostino *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 2004). Darüber hinaus gibt es noch zwei Typ-C-ARR-Gene (*ARR22* und *ARR24*), die wie Typ-A-ARRs keine DNA-Bindedomäne besitzen, sich aber sonst von diesen strukturell stark unterscheiden. Sie werden nicht durch Cytokinin induziert und sind hauptsächlich in reproduktiven Organen aktiv (Kiba *et al.*, 2004; Gattolin *et al.*, 2006; Schaller *et al.*, 2008).

Unter den primären Cytokininantwortgenen befinden sich neben den Typ-A-ARR-Genen auch Gene, die für *Cytokinin Response Factors* (CRFs), eine Gruppe von AP2/ERF-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, kodieren (Rashotte *et al.*, 2003; 2006). Die von ihnen beeinflussten Gene überlappen zu großen Teilen mit den Zielgenen der Typ-B-ARRs (Rashotte *et al.*, 2006). CRF-Proteine wandern als Antwort auf Cytokininbehandlung aus dem Cytosol in den Zellkern, was in Abhängigkeit von den AHKs und AHPs, aber unabhängig von den Typ-B- und Typ-A-ARRs geschieht (Rashotte *et al.*, 2006). Die CRFs interagieren mit AHPs und werden demnach vermutlich wie die Typ-B-ARRs durch diese aktiviert (Rashotte *et al.*, 2006; Cutcliffe *et al.*, 2011). Die CRF-Familie stellt somit einen Gabelungspunkt des Cytokininsignaltransduktionsweges dar und vermittelt cytokininabhängige sowie -unabhängige Funktionen (Rashotte *et al.*, 2006). In *Arabidopsis* gibt es acht Isoformen, die wie die anderen Genfamilien, die in die Cytokininsignaltransduktion verwickelt sind, auf der einen Seite einen hohen Grad an funktioneller Redundanz zeigen, für die auf der anderen Seite aber auch spezifische Funktionen aufgedeckt werden konnten (Hwang *et al.*, 2012; El-Showk *et al.*, 2013; Kieber & Schaller, 2014).

1.1.2.1. Cytokininrezeptoren

Die *Arabidopsis*-Cytokininrezeptoren unterscheiden sich sowohl in ihrem Expressionsmuster als auch in ihrer Substratspezifität. Sie sind hauptsächlich in meristematischem und vaskulärem Gewebe exprimiert, allerdings sind sie grundsätzlich in allen pflanzlichen Organen zu finden (Kieber & Schaller, 2014). *CRE1/AHK4* ist hauptsächlich in der Wurzel exprimiert, vor allem in Perizykelzellen und in der Vaskulatur (Mähönen *et al.*, 2000; Higuchi *et al.*, 2004). In den Sprossgeweben ist *CRE1/AHK4* – abgesehen von der starken Aktivität im SAM – deutlich schwächer exprimiert. *AHK2* und *AHK3* sind im Unterschied zu *CRE1/AHK4* in oberirdischen Geweben stärker exprimiert als in der Wurzel, was sich auch in dem reduzierten Sprosswachstum der *ahk2 ahk3*-Doppelrezeptormutante im Gegensatz zu *cre1 ahk2* und *cre1 ahk3* widerspiegelt (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006).

Alle Rezeptoren binden bioaktive Cytokinine mit hoher Affinität und zeigen nur geringe Affinität gegenüber Adenin oder inaktiven Konjugaten. Trotzdem zeigen sich auch unterschiedliche Substratpräferenzen: *AHK3* besitzt eine höhere Affinität gegenüber *tZ* als gegenüber *iP*, während *AHK2* und *CRE1/AHK4* eine höhere Affinität für *iP* zeigen (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006; Stolz *et al.*, 2011).

Die Unterschiede in der Cytokininspezifität der Rezeptoren sind vermutlich von physiologischer Relevanz und vereinfachen die Langstreckenkommunikation zwischen Spross und Wurzel. Da *tZ*-Cytokinine hauptsächlich über die Xylemgefäße von der Wurzel in den Spross transportiert werden, könnte der vornehmlich im Spross aktive *AHK3*-Rezeptor als Empfänger für das in der Wurzel produzierte *tZ* fungieren. Der in der Wurzel vorherrschende *AHK4*-Rezeptor reagiert hingegen wahrscheinlich auf das im Phloem wurzelwärts transportierte *iP* (Mähönen *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001; Kudo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014a).

1.1.2.2. Responseregulatoren

Mason *et al.* (2004) und Tajima *et al.* (2004) führten phylogenetische Analysen basierend auf der Empfängerdomäne der *Arabidopsis*-ARRs durch. Während alle zehn Typ-A-ARRs einen gemeinsamen Zweig bildeten, wurden die elf Typ-B-ARR-Gene strukturell in drei Untergruppen unterteilt: Untergruppe I enthält sieben Mitglieder (*ARR1*, *ARR2*, *ARR10-12*, *ARR14* und *ARR18*), die Untergruppen II (*ARR13* und *ARR21*) und III (*ARR19* und *ARR20*) jeweils zwei Mitglieder. Expressionsanalysen mittels RT-PCR und GUS-Reporterlinien zeigten, dass die Typ-B-ARRs *ARR1*, *ARR2*, *ARR10*, *ARR11* und *ARR12* die breitesten Expressionsmuster aufweisen, wobei sich diese in teilungsaktiven Geweben überlappen, vor allem im SAM und in jungen Blättern. Die übrigen Typ-B-ARRs sind hauptsächlich in reproduktiven Organen aktiv (Mason *et al.*, 2004; Tajima *et al.*, 2004). Genetische Analysen deuten darauf hin, dass *ARR1*, *ARR2*, *ARR10*, *ARR11* und *ARR12* den Großteil der Cytokininantworten in der pflanzlichen Entwicklung vermitteln. Der gleichzeitige Ausfall mehrerer Typ-B-ARR-Gene hat die gleichen Effekte zur Folge, die

bereits für *ahk*- und *ahp*-Vielfachmutanten beschrieben wurden, z. B. Hemmung des Wurzelwachstums, der Lateralwurzelbildung und der Hypokotylelongation sowie eine verminderte Fähigkeit zur Kallusbildung (Mason *et al.*, 2005; Yokoyama *et al.*, 2007; Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008).

Typ-B-ARR-Gene sind wie die *AHK*- und *AHP*-Gene nicht durch Cytokinin induzierbar (Imamura *et al.*, 1999; Kiba *et al.*, 1999; Brenner *et al.*, 2005). Die Aktivität der Typ-B-ARRs wird stattdessen auf Proteinebene reguliert, zum Einen über den Phosphorylierungsstatus, zum Anderen über proteasomalen Abbau durch den SKP1/Cullin/F-Box(SCF)-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, wobei die Spezifität für die Typ-B-ARRs durch die F-Box-Proteine der KISS-ME-DEADLY(KMD)-Familie vermittelt wird (Kim *et al.*, 2012b; Kim *et al.*, 2013).

In den Promotoren von Typ-A-ARR-Genen sowie anderer Cytokininantwort-vermittelnder Gene wurden Bindesequenzen für Typ-B-ARRs entdeckt, die wichtig für die Induktion dieser Gene durch Cytokinin sind (Taniguchi *et al.*, 2007; Ramireddy *et al.*, 2013). Typ-A-ARR-Gene werden nach Cytokiningabe schnell hochreguliert, einige sogar bereits nach 10-15 Minuten, weshalb sie als primäre Cytokininantwortgene gelten (D'Agostino *et al.*, 2000; Rashotte *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2005). Aufgrund ihrer starken Regulation durch Cytokinin werden die Typ-A-ARR-Promotoren in Reporterlinien verwendet, um Veränderungen in der Cytokininantwort zu verfolgen (D'Agostino *et al.*, 2000; Hwang & Sheen, 2001). Außerdem wurde unlängst ein künstliches Cytokininreportersystem (*Two component output sensor*, TCS) generiert, das aus einem minimalen 35S-Promotor, der DNA-Konsensus-Bindesequenz für Typ-B-ARRs in mehreren hintereinandergeschalteten Wiederholungen und verschiedenen Orientierungen sowie einem Reporter gen besteht (Müller & Sheen, 2008; Zürcher *et al.*, 2013).

Genetische Studien offenbarten den negativen Einfluss von ARR3-ARR9 und ARR15 in der Cytokininsignalkaskade (Kiba *et al.*, 2003; To *et al.*, 2004; Leibfried *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; To *et al.*, 2007). Die funktionelle Redundanz innerhalb der Genfamilie ist teilweise auf die weitreichenden Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz zurückzuführen (D'Agostino *et al.*, 2000). Trotz der hochgradigen funktionellen Redundanz konnten kleineren Gruppen von Typ-A-ARRs spezifische Funktionen zugeordnet werden. Beispielsweise sind im SAM gleichzeitig *ARR5*, *ARR7* und *ARR15* aktiv, um die Cytokininsignaltransduktion zu regulieren (Leibfried *et al.*, 2005; Buechel *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010).

1.1.3. Cytokinindefizienz und -überschuss

Die Überexpression von *CKX*-Genen in *Arabidopsis* und in Tabakpflanzen führt zu einer starken Verringerung des Cytokiningehalts, was in drastischen phänotypischen Veränderungen resultiert, die unter dem Begriff ‚Cytokinindefizienzsyndrom‘ (CDS) zusammengefasst werden. Cytokinindefizienz bewirkt ein verstärktes Wurzelwachstum: Die Primärwurzel ist länger, es werden mehr Seiten- und Adventivwurzeln gebildet und im Wurzelmeristem finden mehr Zellteilungen statt. Demgegenüber führt der reduzierte

Cytokiningehalt zu einer Verkleinerung und damit zu einer reduzierten SAM-Aktivität, was eine verzögerte Entwicklung des Sprosses mit kleineren Organen und stark vergrößerten Zellen zur Folge hat. Außerdem zeichnen sich *CKX*-Überexprimierer u. a. auch durch einen späteren Blühbeginn, dünnere Stengel, weniger Blütenknospen und Blüten, verringerte Apikaldominanz und vergrößerte Samen aus (Werner *et al.*, 2001; 2003). Viele dieser Effekte sind auch bei anderen cytokinindefizienten Pflanzen sichtbar, wie z. B. den Biosynthesemutanten *ipt3,5,7* (Miyawaki *et al.*, 2006) und *cyp735a1 cyp735a2* (Kiba *et al.*, 2013), den Rezeptormutanten *ahk2 ahk3* und *cre1 ahk2 ahk3* (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006) und weiteren Signalkaskademutanten wie *AHP*-Mehrfachmutanten (Hutchison *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010) und *arr1,10,12* (Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008). Die Überexpression eines künstlichen Repressors der Cytokinintransduktion (*p35S:ARR1-SRDX*) vereint ebenfalls viele der genannten Merkmale (Heyl *et al.*, 2008). Die Phänotypen der verschiedenen CDS-Pflanzen und die gegenteiligen Merkmale von Pflanzen mit erhöhtem Cytokininstatus führten zu der Schlussfolgerung, dass Cytokinin ein negativer Regulator des Wurzelwachstums sei, während das Phytohormon das Sprosswachstum in positiver Weise beeinflusst.

Ein häufig beobachteter Aspekt der Cytokinindefizienz ist ein verkleinertes SAM aufgrund einer Verminderung von Zahl und Größe der meristematischen Zellen sowie eine verringerte Aktivität desselben (Werner *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Kurakawa *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2008; Tokunaga *et al.*, 2012; Kiba *et al.*, 2013). Das SAM enthält pluripotente Stammzellen, aus denen die oberirdischen Organe der Pflanze hervorgehen (Bäurle & Laux, 2003). Cytokinin ist für die Bildung und Aufrechterhaltung des SAMs essenziell, was durch Wechselwirkung wichtiger Meristemregulatoren wie *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) und *WUSCHEL* (*WUS*) mit Cytokininmetabolismus (*CKX3*, *IPT7*, *LOG4*) und -signalkaskade (*CRE1/AHK4*, *ARR5*, *ARR7*, *ARR15*) deutlich wird (Jasinski *et al.*, 2005; Leibfried *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2009; Bartrina *et al.*, 2011; Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016). Zudem führt bereits der Ausfall eines einzigen *LOG*-Gens zu einer Reduktion der Meristemgröße (Tokunaga *et al.*, 2012) oder sogar zu einer frühzeitigen SAM-Termination (Kurakawa *et al.*, 2007).

Darüber hinaus sind noch viele weitere Gene mit Funktionen in Cytokininmetabolismus oder -signaltransduktion in begrenzten Regionen des SAMs aktiv. Im organisierenden Zentrum (OZ) in der Mitte des Meristems, das durch die Genaktivität von *WUS* gekennzeichnet ist, werden *AHK4* und *CKX3* exprimiert (Gordon *et al.*, 2009; Bartrina *et al.*, 2011). Auch *AHK2* und *AHK3* sind im SAM-Zentrum aktiv (Gruel *et al.*, 2016). Während der Cytokininrezeptor *AHK4* die Expression von *WUS* aktiviert (Gordon *et al.*, 2009), könnte *CKX3* den Cytokininstatus in der OZ beeinflussen. Der gleichzeitige Genverlust von *CKX3* und *CKX5*, welches ebenfalls im SAM exprimiert wird, führt zu einem Anstieg der *WUS*-Expression. Darüber hinaus bilden die Doppelmutanten vergrößerte Meristeme, mehr Blüten bzw. Schoten, größere Blütenorgane (insbesondere größere Gynoeceen mit einer höheren Anzahl an Samenanlagen) und einen längeren und dickeren Infloreszenzstengel im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Die

höhere SAM-Aktivität dieser Pflanzen führt letztendlich zu einem erhöhten Samenertrag (Bartrina *et al.*, 2011). Der zusätzliche Funktionsverlust von *AHP6*, einem negativen Regulator der Cytokinin-signal-kaskade und an der Stelle im Infloreszenzmeristem exprimiert, an der das nächste Blüten-primordium entsteht, verstärkt die Meristemaktivität zusätzlich (Mähönen *et al.*, 2006; Bartrina *et al.*, 2011; Besnard *et al.*, 2014a).

Der L1-Schicht könnte durch Expression von *LOG4* eine wichtige Rolle als Cytokininquelle des SAMs und als Regulator der Meristemaktivität zukommen. Computermodelle in Kombination mit experimentellen Daten zeigten, dass die Aktivität von *LOG4* möglicherweise einen Hormongradienten etabliert, der den Zellen des OZ Informationen über die Position des OZ relativ zur L1-Schicht liefern könnte, um die Meristemorganisation unabhängig von Zellteilungsaktivität und Zelldifferenzierungsprozessen aufrecht-zuerhalten (Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016).

Ein weiteres, offensichtliches Merkmal cytokinindefizienter Pflanzen ist das oftmals reduzierte Spross-wachstum. Die reduzierte Blattgröße resultiert dabei aus einer verringerten Zellteilungsaktivität, sodass die Blätter verstärkt durch Zellexpansion wachsen und letztendlich aus weniger, aber vergrößerten Zellen im Vergleich zum Wildtyp bestehen (Werner *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006; Kiba *et al.*, 2013). Bestimmten Genen konnte eine dominante Rolle im Spross zugeordnet werden, die sich nicht nur in ihren Expressionsmustern, sondern vor allem in den Defekten des Sprosswachstums der jeweiligen Mutanten widerspiegelt. Beispielsweise hat *ahk2 ahk3* als einzige Doppelrezeptor-mutante eine kleinere Rosette und kürzere, dünnere Stengel im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen das Wurzelwachstum in einigen Allelkombinationen nicht betroffen ist (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Der simultane Genverlust von *IPT3*, *IPT5* und *IPT7* hat als einzige Kombination von *ipt*-Mutationen ebenfalls ein reduziertes Sprosswachstum zur Folge (Miyawaki *et al.*, 2006).

In einem EMS-Mutagenese-Screen wurden Mutanten identifiziert, die in der Lage sind, das reduzierte Sprosswachstum von *p35S:CKX1*-Pflanzen zu revertieren (*repressors of cytokinin deficiency, rock*) (Bartrina, 2006). Dabei konnten konstitutiv aktive Varianten der Cytokininrezeptoren *AHK2* (*rock2*) und *AHK3* (*rock3*) identifiziert werden, die eine ständige Aktivität des Cytokininsignaltransduktionsweges bewirken. Die *rock2*-Mutante bildet größere Blätter und Blütenorgane sowie einen längeren und dickeren Infloreszenzstengel. Die *rock3*-Mutante verfügt ebenfalls über größere Blüten und dickere Stengel, während eine größere Blattfläche und ein höherer Wuchs nur in transgenen Linien sichtbar sind, die das Gen unter der Kontrolle eines ca. 2 kb-großen *AHK3*-Promotorfragments exprimieren (Jensen, 2013). Eine Verstärkung des Sprosswachstums ist auch bei *CKX*-Mehrfachmutanten (Bartrina, unveröffentlichte Daten) und bei *p35S:CYP735A2*-exprimierenden Pflanzen (Kiba *et al.*, 2013) zu beobachten.

Vor allem bei Blättern besonders stark cytokinindefizienter Pflanzen wie *cre1 ahk2 ahk3* und *p35S:CKX1* fällt auf, dass diese zusätzlich zur kleinen Oberfläche eine eher rundliche Form besitzen (Werner *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2004). Kiba *et al.* (2013) fiel auf, dass die *cyp735a1 cyp735a2*-Doppelmutante

29-45 % mehr juvenile Blätter bildete als Wildtyppflanzen, was bedeutet, dass der Übergang von der juvenilen in die adulte vegetative Phase (s. Abschnitt 1.3) in diesen Pflanzen verspätet eintritt. Die Gesamtblätterzahl war hingegen unverändert, sodass davon auszugehen ist, dass der spätere Blühzeitpunkt der Doppelmutante nicht auf eine längere juvenile Phase, sondern auf eine reduzierte Blattbildungsrate zurückzuführen ist.

Über einen regulatorischen Einfluss von Cytokinin auf die Juvenil-adult-Transition ist bisher nur sehr wenig bekannt. Allerdings resultiert eine Modifikation des Cytokininstatus nicht selten in einem veränderten Plastochronindex und/oder verändertem Blühverhalten. Bei cytokinindefizienten Pflanzen tritt der verspätete Blühbeginn oft in Verbindung mit einem verlängerten Plastochron auf. Dies ist z. B. für *ahp1,2,3,4,5* (Hutchison *et al.*, 2006), *cre1 ahk2 ahk3* (Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006), *ipt3,5,7* (Miyawaki *et al.*, 2006), *LOG*-Mehrfachmutanten (Tokunaga *et al.*, 2012) und p35S:CKX-Pflanzen (Werner *et al.*, 2001; 2003) bei Wachstum unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) dokumentiert. Auch für die *ahk2 ahk3*-Doppelmutante konnte für bestimmte Allele ein späterer Blühbeginn bei unveränderter Blätterzahl gezeigt werden (Nishimura *et al.*, 2004). Die *gain-of-function*-Mutanten *rock2*, pAHK2:rock2 und pAHK3:rock3 blühen hingegen unter Langtagbedingungen aufgrund einer geringeren Anzahl an Blättern früher als der Wildtyp (Jensen, 2013).

Der bisherige Kenntnisstand über den Einfluss von Cytokinin auf die Blühinduktion ordnet dem Phytohormon eher eine Rolle unter nicht-induktiven Kurztagverhältnissen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) zu. Die exogene Cytokininapplikation induziert den Blühbeginn bei *Arabidopsis* unter Kurztagbedingungen durch Aktivierung des zum Florigen *FLOWERING LOCUS T (FT)* paralogen Gens *TWIN SISTER OF FT (TSF)* sowie *FD* und *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1)*, die für wichtige Blühregulatoren kodieren (Michniewicz & Kamieńska, 1965; D'Aloia *et al.*, 2011). *CKX*-Mehrfachmutanten blühen nur unter Kurztagbedingungen bis zu zehn Tagen früher als der Wildtyp (Bartrina, 2006). Im Gegensatz zum verspäteten Blühbeginn unter Langtagbedingungen sind *CKX1*-Überexpressionspflanzen unter nicht-induktiven Bedingungen überhaupt nicht in der Lage, die reproduktive Phase zu erreichen; die Pflanzen verweilen in der vegetativen Phase und gehen letztendlich ein. Interessanterweise kann die Expression von *rock2* die Fähigkeit zur Blühinduktion wiederherstellen, während *rock3* nicht dazu imstande ist (Jensen, 2013).

Im Folgenden wird die Regulation der Organgröße und die Rolle der Epidermis bei der Größendetermination sowie das Thema Entwicklungsübergänge mit Fokus auf den miR156-abhängigen autonomen Signalweg genauer behandelt.

1.2. Determination der Größe eines pflanzlichen Organs

1.2.1. Das Sprossapikalmeristem (SAM)

Während der pflanzlichen Embryogenese entstehen an den beiden Enden der apikal-basalen Achse zwei primäre Meristeme, das Spross- und das Wurzelapikalmeristem (Ten Hove *et al.*, 2015), deren Aktivität das Wachstum und die Entwicklung aller Spross- und Wurzelorgane kontrolliert. Während des vegetativen Wachstums produziert das SAM Stengelsegmente, die je nach Pflanzenspezies elongieren oder kompakt bleiben können, und Blätter, in deren Achseln wiederum Sekundärstängel entstehen können. Eine Kombination aus endogenen Signalen und Umweltfaktoren, wie Fotoperiode, Temperatur und Stress, bewirkt schließlich eine Umwandlung des vegetativen SAMs in ein Infloreszenzmeristem, aus dem die Blüten hervorgehen (Galvan-Ampudia *et al.*, 2016).

Am höchsten Punkt in der Mitte des SAMs befindet sich die zentrale Zone (ZZ), in der sich pluripotente Stammzellen befinden, die sich unentwegt teilen und Zellen in die darunter liegende Rippenzone (RZ) und die sie ringförmig umgebende Peripherzone (PZ) abgeben. Aus der RZ gehen die Zellen des Leitgewebezyllinders in der Sprossachse hervor, während die PZ die Cortexgewebe der Nodien und Internodien sowie die Anlagen für Blätter und Blüten bildet. Abgesehen von dieser funktionalen Unterteilung wird das SAM darüber hinaus in drei klonale Zellschichten eingeteilt: Die Zellen der jeweils einreihigen L1- und L2-Schicht teilen sich ausschließlich antiklin zur Meristemoberfläche und bilden die Epidermis bzw. die subepidermalen Gewebe, während die sich multidirektional teilenden Zellen der L3-Schicht den Meristemkorpus bilden und die verschiedenen Zelltypen des Leitgewebes hervorbringen (Ha *et al.*, 2010).

Die Integrität des SAMs wird durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und anderer Faktoren wie z. B. Phytohormonen (vor allem Cytokinin und Auxin) ermöglicht. Die beiden Homeobox-Transkriptionsfaktoren SHOOTMERISTEMLESS (STM) und WUSCHEL (WUS) nehmen Schlüsselrollen bei der Regulation des Meristems ein. Das *KNOTTED1-LIKE HOMEBOX(KNOX)*-Gen *STM* wird in allen Zellen des SAMs (mit Ausnahme der Primordien) exprimiert und verhindert eine frühzeitige Differenzierung der meristematischen Zellen. Es ist für die Etablierung und Aufrechterhaltung des Meristems essenziell und wirkt u. a. durch die Anregung der Cytokininbiosynthese im SAM (Long *et al.*, 1996; Yanai *et al.*, 2005). WUS gewährleistet wiederum die gleichbleibende Größe der Stammzellpopulation und verhindert so eine frühzeitige Meristemtermination (Mayer *et al.*, 1998; Fletcher *et al.*, 1999; Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000).

1.2.2. Organentwicklung und -wachstum

Das Wachstum neuer pflanzlicher Organe wird durch Zellteilung und Zellexpansion angetrieben, zwei Prozesse, die durch Phytohormone (z. B. Auxin, Cytokinin und Gibberellin) und andere endogene Signale

sowie Umweltfaktoren beeinflusst werden. Letztere beeinflussen u. a. den Kohlenstoffmetabolismus, welcher über das Signalmolekül Trehalose-6-phosphat das Organwachstum beeinflusst (Schluepmann *et al.*, 2012; Lunn *et al.*, 2014). Die regulatorischen Mechanismen, die dem Blatt- und Blütenwachstum zugrunde liegen, zeigen einige Gemeinsamkeiten, aber auch große Unterschiede, sodass im Folgenden in erster Linie die Prozesse beschrieben werden, die die endgültige Größe eines Blattes determinieren. Nach heutigem Kenntnisstand lässt sich die Entwicklung neuer Blätter durch fünf sich überlappende und sich gegenseitig beeinflussende Phasen beschreiben: einer Initiationsphase, einer allgemeinen Zellteilungsphase, einer Übergangsphase, einer Zellexpansionsphase und einer Meristemoidteilungsphase (Abb. 2). Nachfolgend wird die Regulation und Koordination dieser Phasen und die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren, Phytohormonen und anderer Faktoren beschrieben.

Organinitiation am Sprossapikalmeristem

Die Initiation eines neuen Organs in der PZ des SAMs erfolgt stets in maximalem Abstand zu bereits bestehenden Organanlagen (Snow & Snow, 1931) und wird durch ein lokales Auxinmaximum ausgelöst (Benková *et al.*, 2003). Der Auxin-*efflux-carrier* PIN-FORMED 1 (PIN1), der nach dem nadelförmigen, organfreien Infloreszenzstengel der *pin1*-Mutante benannt ist (Okada *et al.*, 1991), transportiert das Phytohormon (hauptsächlich über die Epidermis) zur nächsten Initiationsstelle (P_0) und erzeugt dabei zugleich inhibitorische Felder rund um bereits entstehende Organe. Wenngleich der Infloreszenzphänotyp der *pin1*-Mutante der augenscheinlichere ist, zeigt die Mutante auch während der vegetativen Phase phyllotaktische Defekte (Okada *et al.*, 1991; Reinhardt *et al.*, 2003; Heisler *et al.*, 2005; Guenot *et al.*, 2012).

Weiterhin sind Inhibitoren der Cytokininsignaltransduktion, wie z. B. der Responseregulator ABERRANT PHYLLOTAXIS 1 (ABPH1) in Mais oder das Pseudohistidinphosphotransferprotein AHP6 in *Arabidopsis* an der Organinitiation beteiligt, deren Funktionsverlust zu phyllotaktischen Defekten führt (Giulini *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009b; Besnard *et al.*, 2014a). Außerdem ist die Herunterregulation von *KNOX*-Genen in der P_0 kritisch für die Organinitiation (Hay & Tsiantis, 2010). *KNOX*-Expression wird durch Auxin reguliert (Hay *et al.*, 2006) und *KNOTTED1* beeinflusst wiederum viele Gene der Auxinsignaltransduktion (Bolduc *et al.*, 2012). Demnach gibt es regulatorische Interaktionen zwischen diesen Transkriptionsfaktoren und dem Auxinsignalweg.

Sobald eine Organinitiationsstelle etabliert wurde, wird das sich entwickelnde Organ vom Meristem abgegrenzt. In diesen Abgrenzungsdomänen sind viele Gene exprimiert, deren Produkte das Wachstum limitieren und die Differenzierung in diesen Regionen hemmen und somit den undifferenzierten Zustand des Meristems aufrechterhalten (Sluis & Hake, 2015). Dazu gehören u. a. die Gene der *CUP-SHAPED-COTYLEDON(CUC)*-Familie, die durch *KNOX*-Gene und Auxin reguliert werden (Aida *et al.*, 2002; Hibara *et al.*, 2006; Spinelli *et al.*, 2011; Takeda *et al.*, 2011).

Die Zellteilungsphase und die *cell cycle arrest front*

Die Anzahl der Blattgründerzellen in der P_0 -Region ist abhängig von der Pflanzenspezies und reicht von 5-10 Zellen pro Schicht in *Arabidopsis* (Furner & Pumfrey, 1992; Irish & Sussex, 1992) bis etwa 50-100 Zellen pro Schicht in Tabak (Poethig & Sussex, 1985), Mais (Poethig & Szymkowiak, 1995) und der Baumwollpflanze (Dolan & Poethig, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass sich Veränderungen in der Gründerzellzahl in der P_0 auf die Größe von Blättern und Petalen auswirken können (Autran *et al.*, 2002; Eloy *et al.*, 2012; Trost *et al.*, 2014).

Zunächst findet im gesamten Primordium Zellproliferation statt (Abb. 2), wobei die Größe der Zellen konstant und klein bleibt. Die finale Zellanzahl, die durch die Zellteilungsrate und die Länge der Zellproliferationsphase bestimmt wird, wirkt sich entscheidend auf die endgültige Größe eines Blattes aus (Gonzalez *et al.*, 2012). Die Zellproliferation wird zunächst an der Blattspitze eingestellt (Donnelly *et al.*, 1999). Es bildet sich eine sog. *cell cycle arrest front* aus, eine Grenze zwischen den sich weiterhin teilenden Zellen der Blattbasis und der Zone an der Blattspitze, welche ausschließlich über Zellexpansion wächst (Abb. 2). Die *cell cycle arrest front* bleibt für mehrere Tage in einer konstanten Entfernung zur Blattbasis (in dieser Übergangsphase befindet sich also eine meristemähnliche Region an der Blattbasis) und bewegt sich schließlich auf diese zu (Abb. 2) (Kazama *et al.*, 2010; Andriankaja *et al.*, 2012).

Die Länge der Zellteilungsphase wird u. a. durch eine Kaskade aus Transkriptionsfaktoren und microRNAs (miRNAs), die Zellteilung und Zelldifferenzierung koordiniert, beeinflusst. Die Klasse-II-*TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF(TCP)*-Genfamilie fördert die Zelldifferenzierung (Abb. 2) (Efroni *et al.*, 2008). In *Arabidopsis* werden fünf Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorfamilie durch miR319 reguliert (Abb. 2) (Palatnik *et al.*, 2003). Die Überexpression dieser miRNA verlängert die mitotische Aktivität entlang der Blattränder, was zu übermäßigem Wachstum der Blattränder und zur Bildung von Blättern mit mehr Zellen führt (Palatnik *et al.*, 2003; Efroni *et al.*, 2008). Für TCP4 konnte außerdem gezeigt werden, dass es das proliferative Wachstum begrenzt, indem es die Sensitivität des Blattes gegenüber Cytokinin reduziert (Efroni *et al.*, 2013). Klasse-II-TCPs aktivieren wiederum die Expression einer weiteren miRNA, miR396, die mehrere Mitglieder der zellteilungsfördernden *GROWTH-REGULATING-FACTOR(GRF)*-Transkriptionsfaktorfamilie reguliert (Abb. 2) (Liu *et al.*, 2009a; Rodriguez *et al.*, 2010). Zusammen mit den transkriptionellen Co-Aktivatoren der *GRF-INTERACTING-FACTOR(GIF)*-Familie halten GRFs die Zellproliferation aufrecht (Abb. 2) (Kim & Kende, 2004; Horiguchi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009a). Für GIF1/*ANGUSTIFOLIA3(AN3)* konnte zudem gezeigt werden, dass es die Transkription von *CRF2* und *ARR4* reguliert (Vercruyssen *et al.*, 2014).

Das Ubiquitin-Bindeprotein DA1 begrenzt zusammen mit den E3-Ubiquitinligasen DA2 und ENHANCER OF DA1-1/*BIG BROTHER (EOD1/BB)* die Länge der Proliferationsphase (Abb. 2), wahrscheinlich indem es den proteasomalen Abbau von Schlüsselfaktoren vermittelt. Eine *loss-of-function*-Mutation in einem

dieser Gene führt zu größeren Blättern und Blüten, die Organe der Doppelmutanten *da1-1 eod1* und *da1-1 da2-1* sind sogar noch stärker vergrößert (Disch *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2013).

Die beiden Gene *AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE (ARGOS)* und *AINTEGUMENTA (ANT)* beeinflussen ebenfalls die Dauer der Zellproliferation. *Loss-of-function*-Mutanten bilden kleinere Blätter mit geringerer Zellzahl (Mizukami & Fischer, 2000; Hu *et al.*, 2003). *ARGOS* kodiert ein kleines, pflanzenspezifisches Protein ohne identifizierbare funktionelle Domäne und wird durch Auxin stark induziert (Hu *et al.*, 2003). *ARGOS* fördert die Zellteilung, indem es die Expression des DNA-Bindeproteins *ANT* stimuliert, das wiederum ein Zellzyklusaktivatorgen induziert, das für das Typ-D-Cyclin *CYCD3;1* kodiert (Abb. 2) (Mizukami & Fischer, 2000). Die Aktivität von *ANT* und *CYCD3;1* wird durch den Auxin-Responsefaktor *ARF2* reprimiert (Abb. 2) (Schruff *et al.*, 2006). *ARF2* selbst kann durch die durch Brassinosteroide (BRs) regulierte Kinase *BIN2* phosphoryliert und auf diese Weise inaktiviert werden (Abb. 2) (Vert *et al.*, 2008).

Auxin fördert noch auf einem weiteren Weg die Expression von *CYCD3;1*. *ERBB-3 EPIDERMAL GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 1 (EBP1)* wird durch Auxin stabilisiert und stimuliert die *CYCD3;1*-Expression (Abb. 2). Das menschliche *EBP1*-Homolog spielt bei der ribosomalen Biogenese eine wichtige Rolle. Aufgrund der hochgradigen Proteinsequenzübereinstimmungen nimmt man eine ähnliche Funktion in Pflanzen an. *EBP1* beeinflusst nicht nur die Dauer der Zellproliferationsphase, sondern fördert zusätzlich die Zellteilungsrate und die Zellexpansion (Abb. 2) (Squatrito *et al.*, 2004; Horváth *et al.*, 2006).

Viele der genannten Faktoren übernehmen mehrere Funktionen bei der Blattentwicklung, vor allem GRFs und GIFs, die nicht nur die Länge der Zellproliferationsphase bestimmen, sondern auch einen Einfluss auf die Zellteilungsrate haben (Horiguchi *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2012; Vercruyssen *et al.*, 2014). Beispielsweise werden in Primordien der *gif1 gif2 gif3*-Dreifachmutante *CYCB1;1* und andere Zellzyklus-assoziierte Gene schwächer exprimiert, was zu einer verminderten Zellteilungsrate führt (Lee *et al.*, 2009a). Darüber hinaus spielt der Proteinkomplex *APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome)* für die Dauer eines Zellzyklus eine entscheidende Rolle, da er über den Abbau zentraler Zellzyklusproteine, wie z. B. Typ-A- und Typ-B-Cycline, den Austritt aus der Mitose reguliert (Sullivan & Morgan, 2007; Marrocco *et al.*, 2010). Die Überexpression der *Arabidopsis*-Gene *APC10* und *CELL DIVISION CYCLE PROTEIN 27 HOMOLOG A (CDC27α)*, die für *APC/C*-Untereinheiten kodieren, führt entsprechend zu einer Zunahme der finalen Zellanzahl (Abb. 2) (Rojas *et al.*, 2009; Eloy *et al.*, 2011).

Gibberellin (GA) ist ebenfalls in die Regulation der Zellteilungsaktivität involviert (Abb. 2). Die Überexpression des Biosynthesegens *GIBBERELLIN 20-OXIDASE 1 (GA20OX1)* resultiert in einem Anstieg bioaktiver GA-Metabolite, was die Bildung größerer Blätter zur Folge hat (Huang *et al.*, 1998; Coles *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2010). Der E3-Ubiquitinligasekomplex *SCF/SLEEPY1(SLY1)* ist in den Gibberellin-vermittelten Abbau der wachstumshemmenden *DELLA*-Proteine involviert. Pflanzen, in denen *DELLA*-

Proteine stabilisiert sind, wie z. B. in der *sly1*-Mutante, zeigen Kleinwuchs, z. T. wegen reduzierter Zellproliferations- und Zellexpansionsrate (Achard *et al.*, 2009).

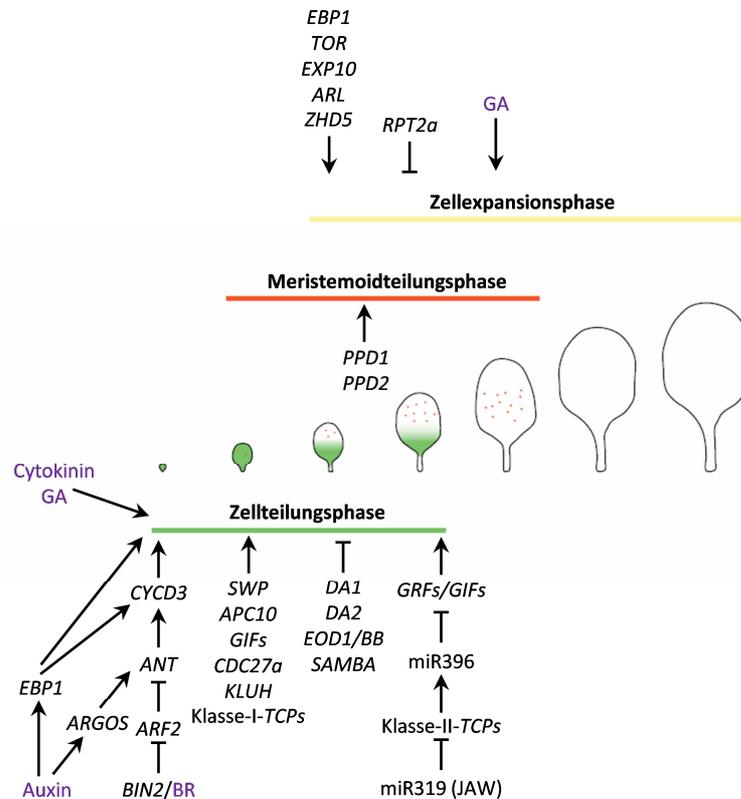


Abb. 2: Faktoren und Signalwege, die die Blattentwicklung und Blattgröße beeinflussen. Verändert nach Gonzalez *et al.* (2012).

Abkürzungen: ANT = AINTEGUMENTA, ARF2 = AUXIN RESPONSE FACTOR 2, ARL = ARGOS-LIKE; APC10 = ANAPHASE PROMOTING COMPLEX 10, ARGOS = AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE, BIN2 = BRASSINO-STEROID-INSENSITIVE 2, CDC27a = CELL DIVISION CYCLE PROTEIN 27 HOMOLOG A, CYCD3 = CYCLIN D3, EBP1 = ERBB-3 EPIDERMAL GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN, EOD1/BB = ENHANCER OF DA1-1/BIG BROTHER, EXP10 = EXPANSIN 10, GA = Gibberellin, GIF = GRF-INTERACTING FACTOR, GRF = GROWTH-REGULATING FACTOR, PPD = PEAPOD, RPT2a = REGULATORY PARTICLE AAA-ATPASE 2a, SWP = STRUWWELPETER, TCP = TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PCF, TOR = TARGET OF RAPAMYCIN, ZHD5 = ZINC FINGER HOMEODOMAIN 5.

Für die Beendigung der Proliferationsphase wird derzeit ein Szenario diskutiert, das dem bei der Flügelgrößendetermination von *Drosophila* (Hufnagel *et al.*, 2007) ähnelt (Czesnick & Lenhard, 2015). Demnach produziert das Cytochrom P450 KLUH/CYP78A5 in der Organperipherie ein mobiles, wachstumsstimulierendes Signal, dessen Konzentration mit zunehmender Größe des Blattes zur Blattmitte hin abnimmt. Das Fehlen des Wachstumssignals bewirkt die Einstellung der Zellteilung in diesem Bereich. Da sich die Zellen in der Peripherie aber weiter teilen, entsteht ein mechanischer Stress, der schlussendlich die Beendigung des proliferativen Wachstums bewirkt (Anastasiou *et al.*, 2007; Kazama *et al.*, 2010). Eine klonale Analyse legt jedoch nahe, dass die Reichweite der Aktivität des KLUH-abhängigen Signals über individuelle Organe hinausgeht, was dieses Szenario weniger wahrscheinlich macht (Eriksson *et al.*, 2010).

Die Zellexpansionsphase und die Meristemoidteilungsphase

Wenn die Blattflächen von *Arabidopsis* und Tabak etwa zehn Prozent ihrer finalen Größe erreicht haben, wird die Zellteilung eingestellt und das Blattwachstum findet nur noch über turgorgetriebene Zell-expansion, Zellwandauflockerung und *de-novo*-Synthese von Zellwandkomponenten statt, was zu einer Vergrößerung der Zellen und damit des sich entwickelnden Organs führt (Poethig & Sussex, 1985; Donnelly *et al.*, 1999; Efroni *et al.*, 2010; Cosgrove, 2016). Im Gegensatz zur immer länger werdenden Liste an Faktoren, die die Zellproliferation kontrollieren, ist über die Regulation des Organwachstums durch Zellexpansion sehr viel weniger bekannt. Interessanterweise führen vor allem Defekte von Faktoren, die grundlegende zelluläre Prozesse regulieren (z. B. Ribosomen), zur Ausbildung kleinerer Zellen (Tsukaya *et al.*, 2013).

An der Auflockerung und Erweiterung der Zellwand sind u. a. Expansine beteiligt (Sampedro & Cosgrove, 2005). Die Überexpression von *EXP10* resultiert in größeren Blättern mit vergrößerten Zellen (Abb. 2) (Cho & Cosgrove, 2000). Die verstärkte Expression anderer Gene, wie z. B. *ARGOS-LIKE (ARL)*, einem *ARGOS*-Homolog, und *ZINC FINGER HOMEODOMAIN 5 (ZHD5)*, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, hat ähnliche Auswirkungen (Hu *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2011), die Ursache für die Zellgrößen-zunahme ist aber noch weitestgehend unbekannt.

In *Arabidopsis* beeinflusst die Aktivität der evolutionär konservierten Kinase TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) die Anzahl an translational aktiven Polysomen und stimuliert die Expression von rRNA-Genen in Abhängigkeit von Nährstoffzustand und Umweltbedingungen. *TOR*-Überexpression resultiert in größeren Organen mit größeren Zellen (Abb. 2) (Deprost *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2011). Mehrere Mitglieder der Klasse-I-TCP-Familie aktivieren die Expression ribosomaler Gene und von *CYCB1;1*, welches am G2/M-Übergang des Zellzyklus stark exprimiert wird (Li *et al.*, 2005a; Danisman *et al.*, 2012). Zudem reprimieren sie die Biosynthese von Jasmonsäure, welche die Zellteilung und die Endoreduplikation hemmt (Pauwels *et al.*, 2008; Danisman *et al.*, 2012).

In *Arabidopsis* ist Zellexpansion mit Endoreduplikation verbunden, einer Variation des Zellzyklus, während der mehrere Genomduplikationen ohne nachfolgende Zellteilung stattfinden (Beemster *et al.*, 2005). Zwar wurde bereits in mehreren Pflanzenspezies eine Korrelation zwischen Ploidielevel und Zellgröße beschrieben (Melaragno *et al.*, 1993; Kondorosi *et al.*, 2000; Galbraith *et al.*, 2001; Sugimoto-Shirasu & Roberts, 2003), allerdings können Zellen auch ohne eine Zunahme der nukleären DNA eine beträchtliche Größe erreichen (De Veylder *et al.*, 2001). Für einen kausalen Zusammenhang von Endoreduplikation und finaler Blattgröße gibt es bisher nur wenige Beweise (Gonzalez *et al.*, 2010). Der *Knockout* des Gens *REGULATORY PARTICLE AAA-ATPASE 2a (RPT2a)*, das für eine Untereinheit des 26S-Proteasoms kodiert, führt zur Produktion größerer Zellen (Abb. 2). Die längere Expansion der Zellen ist mit einer Zunahme des Ploidielevels verbunden (Kurepa *et al.*, 2009; Sonoda *et al.*, 2009).

In Pflanzen mit verringerter Zellproliferation lässt sich beobachten, dass die reduzierte Zellzahl z. T. durch verstärkte Zellexpansion kompensiert wird, und sogar der umgekehrte Fall lässt sich beobachten (Horiguchi & Tsukaya, 2011). So kommt es beispielsweise zu einer reduzierten Zellzahl in *an3*- oder *ant*-Mutanten und zu einer Zunahme der Zellgröße, die allerdings nicht ausreicht, um die Abnahme der Blattfläche zu kompensieren (Mizukami & Fischer, 2000; Horiguchi *et al.*, 2005). Das Kompensationsphänomen lässt sich auch in cytokinindefizienten Pflanzen beobachten (s. Abschnitt 1.1.3). Die molekularen Mechanismen dahinter sind weitestgehend ungeklärt.

Während der Zellexpansionsphase beginnen die meisten Zellen auszdifferenzieren. Einige, über die Blattfläche verstreute Zellen aber, die Meristemoide, teilen sich weiter (Abb. 2) und bilden schließlich spezifische Zelltypen, wie z. B. stomatäre Schließzellen oder provaskuläre Zellen (Nadeau & Sack, 2002; Fisher & Turner, 2007; Peterson *et al.*, 2010). Die stomatäre Zelllinie produziert nicht nur die Zellen der Spaltöffnungen, sondern zudem eine große Anzahl an epidermalen Zellen (67 % aller Epidermiszellen in Kotyledonen, 48 % in Blättern) (Geisler *et al.*, 2000; Bergmann & Sack, 2007). Somit leisten die Meristemoide einen großen Beitrag zur endgültigen Blattgröße. Der Funktionsverlust der *PEAPOD*-Gene *PPD1* und *PPD2*, die für putative DNA-bindende Proteine kodieren, verlängert die Zellteilungsphase dieser Zellen (Abb. 2) und führt zu größeren, kuppelförmigen Blättern (White, 2006).

1.2.3. Die Rolle der Epidermis bei der Organentwicklung

Die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellschichten ist für die Koordination von Wachstumsprozessen essenziell. Bisher ist über den Beitrag der drei Zellschichten des SAMs und von ihnen gebildeter autonomer und nicht-autonomer Faktoren zur endgültigen Größe eines Organs nicht viel bekannt. Eine ungemein wichtige Rolle kommt wahrscheinlich der äußeren L1-Schicht und der von ihr gebildeten Epidermis zu (Savaldi-Goldstein & Chory, 2008). Die Epidermis ist die äußere Zellschicht des Sprosses, die sich durch größtenteils antikline Zellteilung, die Bildung einer wasserabweisenden Schicht (Cuticula) und spezialisierte Zelltypen, wie stomatäre Schließzellen und Trichome, auszeichnet. Zusätzlich zu ihrer Schutzfunktion (Yeats & Rose, 2013) spielt sie auch bei der Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation im SAM (Knauer *et al.*, 2013) und der Regulation des Organwachstums (Czesnick & Lenhard, 2015) eine wichtige Rolle. Außerdem werden die protodermalen Zellen des SAMs und des Embryos für die Produktion und den Transport des Phytohormons Auxin benötigt, was die Bildung der apikal-basalen embryonalen Achse und die Initiation von Organanlagen steuert (Reinhardt *et al.*, 2003; Kierzkowski *et al.*, 2013; Robert *et al.*, 2013; Wabnik *et al.*, 2013).

Bemis & Torii (2007) konnten zeigen, dass die Hemmung der epidermalen Zellteilung durch spezifische Expression von Inhibitorgenen der Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinase*, CDK) in der äußeren Zellschicht zwar keinen Einfluss auf die Zellanzahl in den subepidermalen Geweben hat, die

Zellen aber nicht so stark wachsen, was auf eine Größenbeschränkung durch die Epidermis hindeutet. Mithilfe transgener *Arabidopsis*-Pflanzen, in denen nur die Epidermis zur Perzeption von BRs in der Lage ist bzw. in denen BRs spezifisch abgebaut werden, zeigten Savaldi-Goldstein *et al.* (2007), dass die äußere Zellschicht die Zellexpansion in den darunterliegenden Geweben beeinflusst. BRs sind wachstumsfördernde, weitestgehend immobile Phytohormone, deren Mutanten hauptsächlich aufgrund von Zellexpansionsdefekten kleinwüchsig sind (Bishop *et al.*, 1996; Szekeres *et al.*, 1996; Nakaya *et al.*, 2002; Symons & Reid, 2004; Nakamura *et al.*, 2006; Savaldi-Goldstein *et al.*, 2007). Phytosulfokine (PSK), zell-elongationsfördernde Peptide, können durch alleinige Perzeption in der Epidermis und in Abhängigkeit von BRs das Spross- und Wurzelwachstum stimulieren (Hartmann *et al.*, 2013).

Auch wenn den inneren Zellen eine gewisse Autonomie hinsichtlich ihrer Teilungsaktivität zugesprochen wird (Bemis & Torii, 2007), belegen mehrere Studien die Wichtigkeit der Epidermis für die Regulation der Zellproliferation in sich entwickelnden Organen. Experimente mit genetischen Mosaiken des *HOBBIT(HBT)*-Gens, das für eine CDC27-homologe APC/C-Untereinheit kodiert, zeigten, dass eine epidermale *HBT*-Expression die in der *hbt*-Mutante in allen Zellschichten verringerte Zellzahl wieder herzustellen vermag (Serralbo *et al.*, 2006). Auch Untersuchungen an Tabakpflanzen, in denen die Epidermis einen anderen Genotyp als die darunterliegenden Zellen besitzt (sog. perikline Chimären), führten zu der Annahme, dass sich die Zellproliferation in der Epidermis auf die Teilungsaktivität der subepidermalen Gewebe auswirkt (Marcotrigiano, 2010). Nobusawa *et al.* (2013) konnten zeigen, dass die Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren (*very-long-chain fatty acids*, VLCFAs) in der Epidermis die Cytokininbiosynthese in der Vaskulatur inhibiert, was die Zellteilungsaktivität in den internen Geweben und dadurch das Sprosswachstum beeinflussen könnte. Die Epidermis produziert nicht nur nicht-zellautonome, wachstumsregulierende Signale, sondern empfängt sie auch. Beispielsweise wird das bereits genannte Protein GIF1/AN3 in Mesophyllzellen produziert und stimuliert die epidermale Zellproliferation (Kawade *et al.*, 2013).

Ob auch Cytokinin als zellteilungsfördernder Faktor zwischen verschiedenen Zellschichten eines sich entwickelnden Organs vermittelt und auf diese Weise das Organwachstum koordiniert oder eher in allgemeiner Weise die Wachstumsprozesse des Organs beeinflusst, ist noch nicht geklärt. Die spezifische Expression von Biosynthesegenen in der L1 und L2 des SAMs und der Organprimordien (Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016) könnten aber einen ersten Hinweis auf eine nicht-zellautonome Funktion von Cytokinin darstellen.

1.3. Entwicklungsübergänge

Der Lebenszyklus einer Pflanze lässt sich in mehrere Entwicklungsphasen untergliedern, die durch spezifische morphologische Merkmale und/oder die Ausbildung neuer Organe gekennzeichnet sind. Während

in der vegetativen Phase vor allem Biomasse aufgebaut wird, dient die reproduktive Phase der Bildung von Blüten und Samen. In der juvenilen vegetativen Phase ist die Initiation des Blühprozesses nicht möglich, Pflanzen erlangen Blühkompetenz erst mit dem Übergang zur adulten vegetativen Phase. Die Übergänge von juveniler zu adulter vegetativer Phase und von vegetativem zu reproduktivem Wachstum werden durch komplexe genetische Programme reguliert, die durch endogene und exogene Faktoren gesteuert werden (Huijser & Schmid, 2011; Hong & Jackson, 2015; Teotia & Tang, 2015).

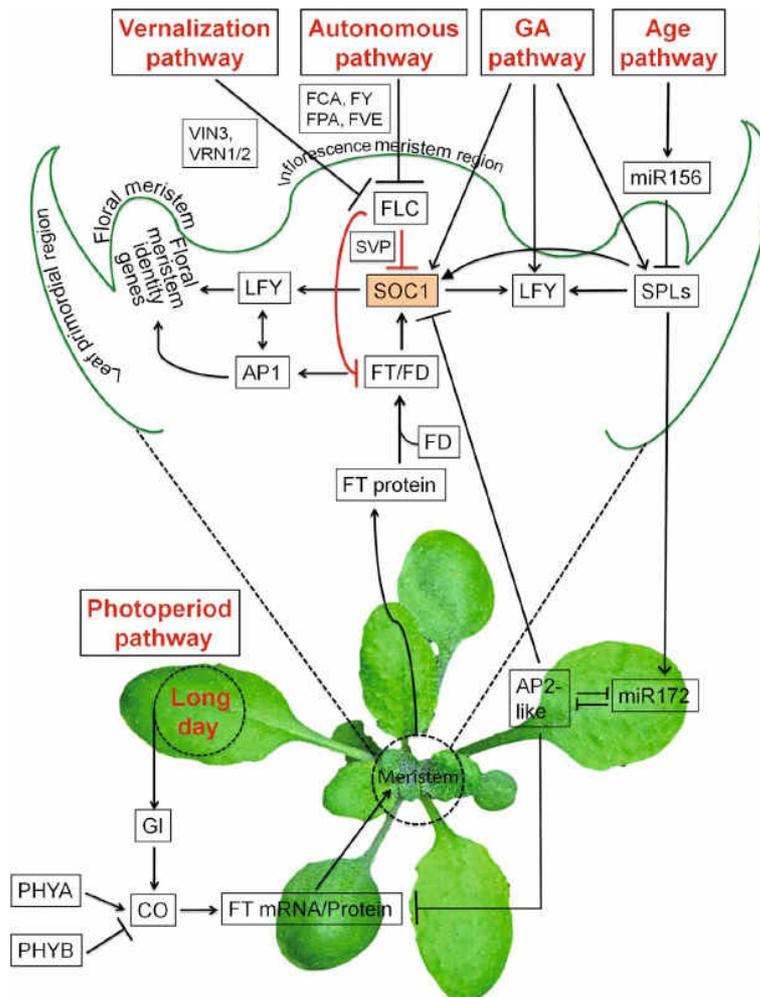


Abb. 3: Vereinfachtes Modell der fünf Hauptsignalwege, die in *Arabidopsis* die Blühinduktion steuern. Der autonome Signalweg und der Vernalisationssignalweg reprimieren die Aktivität des Blührepressors FLOWERING LOCUS C (FLC). *FLC* reprimiert die Blühintegratoren FLOWERING LOCUS T (*FT*) und SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (*SOC1*). Unter Langtagbedingungen führt die sequenzielle Aktivierung von GIGANTEA (*GI*) und CONSTANS (*CO*) zur Akkumulation von FT in den Blättern, das ins SAM transportiert wird, wo es mit FD interagiert. Die Signale aus den verschiedenen Signalwegen führen letztendlich zur Aktivierung von Meristemidentitätsgenen durch FT/FD und SOC1 und zur Blühinduktion. Der GA-Signalweg reguliert hauptsächlich die Expression von LEAFY (*LFY*) und interagiert zudem mit dem miR156-abhängigen autonomen Signalweg (*age pathway*). Beim letztgenannten wirkt sich das Alter der Pflanze auf die Expression von miR156 und miR172 aus. Mit zunehmendem Alter werden Blührepressoren unterdrückt und blühfördernde Gene induziert. Weitere abgebildete Gene sind APETALA 1 (*AP1*), *AP2*, *FCA*, *FPA*, *FVE*, *FY*, PHYTOCHROME A (*PHYA*), *PHYB*, SHORT VEGETATIVE PHASE (*SVP*), SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE (*SPL*), VERNALIZATION 1 (*VRN1*), *VRN2*, VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (*VIN3*). Aus Teotia & Tang (2015).

Licht (Intensität und Tageslänge) gehört zu den wichtigsten Umweltfaktoren, die den Blühzeitpunkt einer Pflanze bestimmen, was zu einer Unterteilung in Langtagpflanzen (z. B. *Arabidopsis*), Kurztagpflanzen (z. B. Reis) und tagneutralen Pflanzen (z. B. Tomate) führte (Hamner, 1940). Die Tageslänge wird von der Pflanze im Wesentlichen durch die zirkadiane Regulation der *CONSTANS(CO)*-Expression und die Stabilisierung des CO-Proteins während der Lichtphase wahrgenommen (Suárez-López *et al.*, 2001; Yanovsky & Kay, 2002; Valverde *et al.*, 2004). Ein weiterer wichtiger Einfluss ist die Umgebungstemperatur. Die Umstellung auf reproduktives Wachstum setzt bei vielen Pflanzen eine längere Kälteperiode voraus, ein Prozess, der als Vernalisation bezeichnet wird (Chouard, 1960). Darüber hinaus können warme Temperaturen den Blühprozess unter nicht-induktiven Kurztagbedingungen erheblich beschleunigen (Blázquez *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2016). Zu den wichtigsten endogenen Faktoren, die den Blühbeginn beeinflussen, zählen Gibberelline (GAs) sowie der Kohlenhydratstatus und das Alter der Pflanze (Srikanth & Schmid, 2011). Die genannten exogenen und endogenen Faktoren steuern fünf Hauptsignalwege: den fotoperiodischen Signalweg, den Vernalisationssignalweg, den GA-Signalweg, den autonomen Signalweg und den miR156-abhängigen autonomen Signalweg (auch *age pathway* genannt) (Abb. 3). Die verschiedenen regulatorischen Signalwege konvergieren letztendlich auf einer Reihe von Blühintegratoren: FT und seinem Paralog TSF, SOC1 und AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24). Diese regulieren die Expression von Meristemidentitätsgenen im SAM und in lateralen Meristemen, darunter *LEAFY (LFY)*, *APETALA 1 (AP1)* und *FRUITFUL (FUL)*, deren Aktivitäten die vegetativen Apices in Infloreszenzmeristeme umwandeln. Sobald die Expression dieser Gene ein bestimmtes Level übersteigt, induzieren die kodierten Proteine die Transkription von Blütenorganidentitätsgenen, woraufhin Blüten gebildet werden (Khan *et al.*, 2014; Hong & Jackson, 2015; Matsoukas, 2015). Neben GA beeinflussen noch weitere Phytohormone die Blühinduktion, z. B. Brassinosteroide (Domagalska *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010), Ethylen (Ogawara *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2007), Salicylsäure (Martínez *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2010), Abscisinsäure (Barth *et al.*, 2006) und Cytokinine (D'Aloia *et al.*, 2011; Bernier, 2013).

Viele Regulatoren, die den Übergang zum reproduktiven Wachstum steuern, spielen auch für den Übergang von juveniler zu adulter vegetativer Phase eine wichtige Rolle und beeinflussen zudem einige der heteroblastischen Merkmale, die diese beiden Phasen charakterisieren. Juvenile Rosettenblätter besitzen lange Petiolen und haben eine rundliche Form. Adulte Blätter sind hingegen länger und größer, und sie verfügen über kürzere Petiolen, gezahnte Blattränder und kleinere Zellen. Die genannten Merkmale verändern sich graduell, sodass sich eine eindeutige Unterscheidung nur durch die Ab- oder Anwesenheit von Trichomen auf der Blattunterseite ergibt (Huijser & Schmid, 2011).

Die Transitionen von juveniler zu adulter vegetativer Phase und von vegetativem zu reproduktivem Wachstum werden hauptsächlich durch zwei evolutionär hochkonservierte miRNAs, miR156 und miR172, reguliert. In den folgenden Abschnitten werden die miRNA-Biogenese sowie die Komponenten und die Wirkungsweise des *age pathway* behandelt.

1.3.1. Biogenese und Wirkungsmechanismus pflanzlicher miRNAs

MiRNAs sind 20-24 nt lange RNA-Moleküle, die die Expression spezifischer Zielgene auf transkriptioneller und/oder translationaler Ebene reprimieren. Sie sind an einer Vielzahl pflanzlicher Prozesse beteiligt, wie z. B. Organwachstum, biotische und abiotische Stressantworten und Entwicklungsübergänge. Ähnlich wie Phytohormone regulieren miRNAs meist mehr als nur einen Entwicklungsprozess (Rogers & Chen, 2013; Curaba *et al.*, 2014). Die meisten Pflanzen besitzen über hundert miRNA-kodierende Gene (*MIR*-Gene), wobei eine miRNA häufig von mehreren Genen kodiert wird (Li & Mao, 2007; Nozawa *et al.*, 2012), was eine spezifische räumliche und zeitliche Regulation erlaubt.

Die *MIR*-Transkription erfolgt in ähnlicher Weise wie die proteinkodierender Gene. *MIR*-Promotoren enthalten häufig eine TATA-Box sowie weitere regulatorische *cis*-Elemente (Megraw *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2013). Ein Mediatorproteinkomplex und weitere allgemeine Transkriptionsfaktoren, wie z. B. CELL DIVISION CYCLE 5 (CDC5), NEGATIVE ON TATA LESS 2A (NOT2A) und NOT2B, rekrutieren die DNA-abhängige RNA-Polymerase II (Pol II) an den *MIR*-Promotor und fördern ihre Aktivität (Kim *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013b; Zhang *et al.*, 2013a). Spezifische Transkriptionsfaktoren, die nur die Expression bestimmter *MIR*-Gene regulieren, wurden ebenfalls identifiziert. Beispielsweise binden die Proteine AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15), AGL18 und FUSCA3 an Promotoren von *MIR156*-Genen und aktivieren deren Expression (Wang & Perry, 2013; Serivichyaswat *et al.*, 2015). POWERDRESS (PWR) wiederum erleichtert die Rekrutierung der Pol II an *MIR172*-Promotoren (Yumul *et al.*, 2013). APETALA 2 (AP2) bindet an die Promotoren von *MIR156*- und *MIR172*-Genen, um die Transkription zu fördern bzw. zu inhibieren (Yant *et al.*, 2010). Die primären *MIR*-Transkripte (pri-miRNAs) werden wahrscheinlich während der Transkription durch die RNA-Bindeproteine DAWDLE (DDL) und PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 (PRL1) stabilisiert (Yu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014b) und zudem mit einer 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende und einem Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende versehen (Abb. 4A) (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Xie *et al.*, 2005). Die Stabilität einiger pri-miRNAs wird wahrscheinlich zusätzlich durch weitere Faktoren und Signale beeinflusst. So verstärkt z. B. Glucose den Abbau von pri-miR156a und pri-miR156c (Yu *et al.*, 2013).

Nach der Transkription werden die pri-miRNAs, die eine unvollkommene Haarnadelstruktur formen (Wang *et al.*, 2007; Merchan *et al.*, 2009), durch die DICER-LIKE(DCL)-Proteine, eine Familie von RNase-III-Endonucleasen, zu kurzen, doppelsträngigen RNAs (dsRNAs) prozessiert (Abb. 4A). DCL1 ist für die miRNA-Biogenese der meisten *MIR*-Gene verantwortlich (Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002; Margis *et al.*, 2006). Die Proteine HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) (Han *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004; Kurihara *et al.*, 2006), SERRATE (SE) (Grigg *et al.*, 2005; Lobbes *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006a) und TOUGH (TGH) (Ren *et al.*, 2012) sind ebenfalls an der pri-miRNA-Prozessierung beteiligt. Sie binden an verschiedene Stellen der pri-miRNA (Hiraguri *et al.*, 2005; Rasia *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Machida *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2012) und sind mit DCL1 assoziiert (Kurihara *et al.*, 2006; Lobbes *et al.*, 2006; Yang *et al.*,

2006a; Qin *et al.*, 2010; Machida *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2012). Während HYL1 und SE die präzise und effiziente Spaltung der pri-miRNAs gewährleisten (Dong *et al.*, 2008), verstärkt TGH die Aktivität von DCL1 (Ren *et al.*, 2012). Es sind noch viele weitere Proteine an der pri-miRNA-Prozessierung beteiligt, z. B. GRP7, das die Transkripte bindet und den Prozess hemmt (Köster *et al.*, 2014). Der miRNA/miRNA*-Duplex, der aus der reifen miRNA (*guide*-Strang) und einem komplementären *passenger*-Strang (miRNA*) besteht, wird schließlich mit 2 nt langen 3'-Überhängen entlassen (Abb. 4A) (Rogers & Chen, 2013). Diese werden durch die S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase HUA ENHANCER 1 (HEN1) methyliert (Abb. 4A) (Yu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006b), wodurch der miRNA/miRNA*-Duplex stabilisiert wird (Li *et al.*, 2005b; Yu *et al.*, 2005; Ramachandran & Chen, 2008).

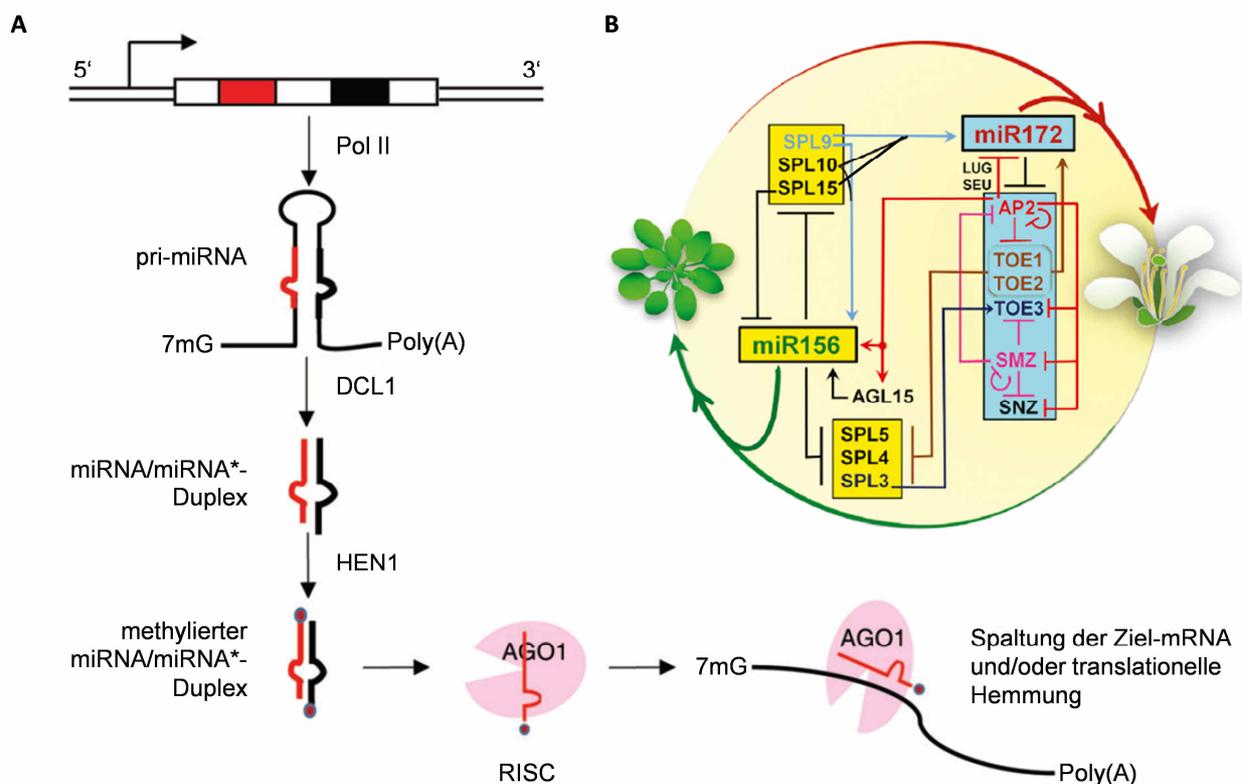


Abb. 4: Die miRNA-Biogenese und der *age pathway*. (A) Vereinfachtes Modell der pflanzlichen miRNA-Biogenese. Beschreibung s. Text; modifiziert nach Zhang *et al.* (2015a). (B) Autoregulatorische Schleife zwischen miR156, miR172 und ihren Zielgenen. MiR156 vermittelt den Abbau von *SPL*-Transkripten, miR172 hemmt die Expression von *AP2-like*-Transkriptionsfaktoren; miR156 wird durch ihre Zielgene *SPL9* und *SPL15* reguliert sowie durch *AP2* und *AGL15*; miR172 wird durch ihre Zielgene *AP2* (über *LUG* und *SEU*), *TOE1* und *TOE2* sowie durch *SPL9*, *SPL10* und *SPL15* reguliert; *TOE1/TOE2* inhibieren die Expression von *SPL3-5*; *SPL3* induziert *TOE3*; *AP2* und *SMZ* hemmen ihre eigene Expression sowie die anderer miR172-Zielgene; modifiziert nach Teotia & Tang (2015).
Abkürzungen: 7mG = 7-Methylguanotin, AGL15 = AGAMOUS-LIKE 15, AGO1 = ARGONAUTE 1, AP2 = APETALA 2, DCL1 = DICER-LIKE 1, HEN1 = HUA ENHANCER 1, LUG = LEUNIG, Pol II = RNA-Polymerase II, RISC = RNA-induced silencing complex, SEU = SEUSS, SMZ = SCHLAFMÜTZE, SNZ = SCHNARCHZAPFEN, SPL = SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE, TOE = TARGET OF EAT.

Der methylierte miRNA/miRNA*-Duplex wird durch HASTY (HST), einem pflanzlichen Homolog des tierischen EXPORTIN5 (EXP5), aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert, allerdings findet auch HST-

unabhängiger Export statt (Zeng & Cullen, 2004; Park *et al.*, 2005). Dort wird die reife miRNA vom *passenger*-Strang getrennt und von ARGONAUTE(AGO)-Proteinen gebunden (Abb. 4A) (Baumberger & Baulcombe, 2005; Takeda *et al.*, 2008; Derrien *et al.*, 2012). In *Arabidopsis* existieren zehn AGO-Proteine (Vaucheret, 2008). Die meisten miRNAs werden in AGO1 aufgenommen, um den *RNA-induced silencing complex* (RISC) zu bilden (Abb. 4A) (Baumberger & Baulcombe, 2005; Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008). Die miRNA-Bindung und Aktivität von AGO1 werden durch SQUINT (SQN) und HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) unterstützt (Smith *et al.*, 2009; Earley & Poethig, 2011; Iki *et al.*, 2012).

Ursprünglich wurde angenommen, dass pflanzliche miRNAs ausschließlich die endonukleolytische Spaltung komplementärer mRNAs durch AGO-Proteine vermitteln. In *Arabidopsis* wird die mRNA nach ihrer Spaltung durch den RISC von der Endoribonuklease XRN4 abgebaut (Souret *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2014). Im tierischen System wurde für den RISC zusätzlich eine translationale Hemmung nachgewiesen (Iwakawa & Tomari, 2015). Mehrere Beispiele einer Regulation auf Proteinebene bei gleichzeitiger Abwesenheit nennenswerter Unterschiede der mRNA-Abundanz führten schließlich zu der Annahme, dass dieser *gene-silencing*-Mechanismus auch in Pflanzen stattfindet (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004; Gandikota *et al.*, 2007; Brodersen *et al.*, 2008; Dugas & Bartel, 2008; Beauclair *et al.*, 2010). Inzwischen konnten viele an der translationalen Inhibition beteiligte Proteine identifiziert werden, z. B. SUO, das bei der Regulation von miR156/157-Zielgenen eine Rolle spielt (Yang *et al.*, 2012). Der Mechanismus der Translationshemmung durch miRNA ist noch weitestgehend ungeklärt, da er sich deutlich vom tierischen Ablauf unterscheidet (Iwakawa & Tomari, 2015).

1.3.2. Der miR156-abhängige, autonome Signalweg (*age pathway*)

Zwei evolutionär hochkonservierte miRNAs, miR156 und miR172, und ihre jeweiligen Zielgene wurden als Schlüsselkomponenten der genetischen Mechanismen identifiziert, welche die pflanzlichen Entwicklungsübergänge sowie einige der damit einhergehenden heteroblastischen Merkmale kontrollieren (Huijser & Schmid, 2011). In *Arabidopsis*, Mais, Tabak und vielen weiteren Pflanzenspezies fördert miR156 Juvenilität, während miR172 das Adultstadium und den Übergang zur reproduktiven Phase begünstigt (Chuck *et al.*, 2007a; Wu *et al.*, 2009; Teotia & Tang, 2015; Zhang *et al.*, 2015b). Die Überexpression von miR156 in *Arabidopsis* führt zu einer erhöhten Anzahl an juvenilen Blättern, einem verkürzten Plastochron, einer starken Reduktion der Apikaldominanz und einer deutlichen Verzögerung der Blühinduktion (Schwab *et al.*, 2005; Wu & Poethig, 2006; Wu *et al.*, 2009; Huijser & Schmid, 2011). Im Gegensatz dazu überspringen miR172-Überexpressionspflanzen die juvenile Phase unter Langtagbedingungen (unter nicht-induktiven Bedingungen ist sie stark verkürzt) und beginnen bereits nach Bildung von zwei bis drei adulten Rosettenblättern zu blühen (Jung *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Huijser & Schmid, 2011). Die Überexpression eines künstlichen Zielgens zur Reduktion der miRNA-Aktivität in

sog. Zielgen-Mimikry(MIM)-Linien resultiert hingegen in gegenteiligen Effekten: p35S:MIM156 ist eine Phänokopie von p35S:MIR172, während p35S:MIM172 zwar nicht den buschigen Phänotyp von p35S:MIR156 ausbildet, aber ebenfalls über eine verlängerte juvenile Phase verfügt und erheblich später zu blühen beginnt (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007; Todesco *et al.*, 2010).

In *Arabidopsis* werden die Vorstufen der miR156 (pri-miR156) von acht Genen kodiert (*MIR156A-H*), die im Spross vor allem im Meristem und in jungen Blättern exprimiert sind (Xie *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2015). Die Abundanz der miR156 ist in frühen Stadien der Sprossentwicklung besonders hoch und nimmt im Laufe der Entwicklung ab, was eine Zunahme der miR172 bewirkt (Aukerman & Sakai, 2003; Jung *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Die miR172 lässt sich ebenfalls im SAM nachweisen und wird von fünf Genen (*MIR172A-E*) kodiert (Chen, 2004; Xie *et al.*, 2005).

Die Zielgene der miR156 kodieren für pflanzenspezifische Transkriptionsfaktoren der SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE(SPL)-Familie (Abb. 4B), die sich durch eine hochkonservierte SBP-DNA-Bindedomäne mit einem speziellen Zinkfingermotiv auszeichnen (Yamasaki *et al.*, 2004). In *Arabidopsis* werden elf der 17 *SPL*-Gene durch miR156 und die sehr ähnliche miR157 reguliert, und zwar hauptsächlich durch mRNA-Abbau (Rhoades *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005; Schwab *et al.*, 2005; Wu & Poethig, 2006; Franco-Zorrilla *et al.*, 2007; Gandikota *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2013). Die mit fortschreitendem Alter abnehmende miR156-Abundanz wird entsprechend von einer Zunahme der *SPL*-Expression begleitet (Cardon *et al.*, 1999; Wu & Poethig, 2006; Shikata *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009).

Arabidopsis-*SPL*-Gene mit einer miR156/157-Zielsequenz werden phylogenetisch und strukturell in vier verschiedene Untergruppen unterteilt (Guo *et al.*, 2008). Nur bei den drei kleinsten *SPL*-Genen (*SPL3*, *SPL4* und *SPL5*) befindet sich das miR156/157-Erkennungselement in der 3'-UTR (Gandikota *et al.*, 2007). Sie fördern adulte Blattmerkmale, wie abaxiale Trichome sowie Zellzahl und -größe, sind an der Blütenentwicklung beteiligt und spielen bei der Regulation des Übergangs zu reproduktivem Wachstum wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle (Wu & Poethig, 2006; Gandikota *et al.*, 2007; Usami *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016). Entsprechend ihrer Funktionen sind sie in adulten Blättern, im Infloreszenzmeristem und Blütenprimordien exprimiert sowie schwach im vegetativen SAM und in jungen Blättern (Cardon *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009; Jorgensen & Preston, 2014). Während *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* keinen Einfluss auf die miR172-Expression haben, konnte für die beiden nah miteinander verwandten *SPL9* und *SPL15* eine direkte Aktivierung von *MIR172B* gezeigt werden (Abb. 4B) (Wu *et al.*, 2009; Hyun *et al.*, 2016). Die beiden Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Juvenil-adult-Transition und bei der Blühinduktion (Schwarz *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Außerdem fördern sie die Bildung von abaxialen Trichomen (Wu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010) sowie die Blattbildungsrate (Schwarz *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008) und beeinflussen die Zellproliferation und/oder -expansion (Usami *et al.*, 2009) und die Blattform (Usami *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). *SPL9* ist in Primordien von vegetativen und reproduktiven Meristemen, nicht jedoch im SAM selbst exprimiert

(Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009), während *SPL15* hauptsächlich im Meristemzentrum exprimiert wird (Hyun *et al.*, 2016). Die beiden genannten SPL-Untergruppen beeinflussen den Blühprozess durch transkriptionelle Regulation beteiligter Gene. *SPL3* und *SPL9* induzieren die Expression von Blühintegratoren, wie z. B. *FT* und *SOC1* (Wang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012a), und Blütenmeristemidentitätsgenen, wie z. B. *AP1*, *LFY* und *FUL* (Wang *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009). Kürzlich zeigten Hyun *et al.* (2016), dass *SPL15* unter nicht-induktiven Bedingungen mit *SOC1* einen Komplex bildet, der ebenfalls die Expression von *FUL* aktiviert.

SPL2, *SPL10* und *SPL11* bilden eine weitere Untergruppe (Guo *et al.*, 2008) und beeinflussen hauptsächlich die Ausbildung adulter Blattmerkmale und die Blattform, wohingegen sie bei der Regulation von Entwicklungsübergängen eher eine untergeordnete Rolle spielen (Shikata *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Über *SPL6* und *SPL13* ist bisher am wenigsten bekannt. *SPL13* beeinflusst wahrscheinlich gemeinsam mit dem miR172-Zielgen *SCHNARCHZAPPEN (SNZ)* den Übergang vom Kotyledonenstadium zum ersten vegetativen Blatt (Martin *et al.*, 2010b, a). Für *SPL10* konnte gezeigt werden, dass es wie *SPL9* und *SPL15* die Transkription von *MIR172B* durch direkte Bindung an den Promotor induziert (Wu *et al.*, 2009; Hyun *et al.*, 2016) und auch *SPL2*, *SPL11* und *SPL13* fördern die *MIR172B*-Expression (Xu *et al.*, 2016).

MiR172 ist in die Regulation von Genen involviert, die Transkriptionsfaktoren mit APETALA 2 (AP2)-DNA-Bindedomäne kodieren (Abb. 4B) (Park *et al.*, 2002; Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004; Schwab *et al.*, 2005). *AP2*, *SCHLAFMÜTZE (SMZ)*, *SNZ*, *TARGET OF EAT 1 (TOE1)*, *TOE2* und *TOE3* hemmen den Übergang zur reproduktiven Phase und sind an der Regulation der Blütenentwicklung beteiligt (Bowman *et al.*, 1991; Jofuku *et al.*, 1994; Aukerman & Sakai, 2003; Schmid *et al.*, 2003; Chen, 2004; Jung *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2014). Das miR172-vermittelte *gene silencing* findet hauptsächlich durch translationale Hemmung statt (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004; Lauter *et al.*, 2005). Mit Ausnahme von *TOE3* zeigen die Transkriptlevel aller miR172-Zielgene eine negative Korrelation zur miR172-Abundanz, sie nehmen mit zunehmendem Alter ab (Aukerman & Sakai, 2003; Jung *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu den übrigen miR172-Zielgenen nimmt die Expression von *TOE3* im Laufe der pflanzlichen Entwicklung zu und ist vor allem in Blüten prominent, was im Einklang mit der Funktion von *TOE3* in der Blütenentwicklung ist (Jung *et al.*, 2007; 2014).

Zusätzlich zu der Hemmung durch miR172 regulieren sich die Zielgene auch untereinander (Abb. 4B). *AP2* inhibiert seine eigene Expression sowie die Transkription von *SMZ*, *SNZ*, *TOE1* und *TOE3* durch direkte Bindung an die Promotoren (Yant *et al.*, 2010). *SMZ* reguliert wiederum die Expression von *AP2* in negativer Weise und hemmt zudem die eigene Transkription sowie die Expression von *SNZ* und *TOE3* (Mathieu *et al.*, 2009). Darüber hinaus regulieren *TOE1* und *TOE2* die miR172-Expression in einer positiven *Feedback*-Schleife, während *AP2* sie negativ beeinflusst (Wu *et al.*, 2009; Yant *et al.*, 2010). Die negative Regulation von miR172 durch *AP2* geschieht zum einen direkt durch Bindung an den *MIR172B*-Promotor, zum anderen indirekt durch Induktion des DELLA-Gens *RGA-LIKE 1 (RGL1)* (Yant *et al.*, 2010).

MiR172 reguliert den Übergang zur adulten Phase, u. a. indem sie die Bildung abaxialer Trichome fördert, z. T. durch die Reprimierung von *TOE1* und *TOE2* (Wu *et al.*, 2009). Zudem induziert AP2 die Expression von *MIR156E* sowie *AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15)*, das seinerseits zusammen mit AGL18 die Transkription von zwei weiteren *MIR156*-Genen aktiviert (Yant *et al.*, 2010; Serivichyaswat *et al.*, 2015). Ansonsten sind miR172 und ihre Zielgene in erster Linie in die Kontrolle vieler in den Blühprozess verwickelter Gene involviert, wodurch sie den Übergang zu reproduktivem Wachstum fördern und die Blütenentwicklung regulieren. In miR172-Überexpressionspflanzen ist die Expression von *FLC*, das einen dominanten Blührepressor kodiert, verringert, während die Expression von *AP1* und *FT* erhöht ist (Lee *et al.*, 2010). Die miR172-abhängige Regulation von *FT* wird durch *TOE1*, *SMZ* und *SNZ* vermittelt, die die Transkription von *FT* hemmen (Jung *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2009). *SMZ* inhibiert zudem die Expression von *AP1* und *SOC1* (Mathieu *et al.*, 2009). *AP2* hemmt u. a. die Expression von *AG*, *AP1*, *FUL* und *SOC1* (Yant *et al.*, 2010). Die Expression von *AG* wird zudem von *TOE3* während der Blütenentwicklung reprimiert (Jung *et al.*, 2014).

Die Expression von miR156, miR172 und ihrer jeweiligen Zielgene wird auf verschiedenen Ebenen und durch diverse Faktoren beeinflusst. Das dsRNA-Bindeprotein *HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1)*, ein wichtiger Regulator der miR156-Biogenese (s. Abschnitt 1.3.1), ist für die Akkumulation von miR156 notwendig. Die *hyl1-2*-Mutante hat eine geringere miR156-Abundanz, erhöhte *SPL*-Transkriptmengen und blüht dementsprechend früher als der Wildtyp (Li *et al.*, 2012). Serivichyaswat *et al.* (2015) konnten zeigen, dass die MADS-Box-Proteine AGL15 und AGL18 an die Promotoren von *MIR156A* und *MIR156C* binden und ihre Transkription aktivieren. Die Transkription von *MIR156*-Genen wird außerdem durch ihre eigenen Ziele reguliert: Während *SPL9* und *SPL10* einen positiven Effekt auf die *MIR156*-Expression zeigen (Wu *et al.*, 2009), wird sie durch *SPL15* inhibiert (Abb. 4B) (Wei *et al.*, 2012).

Die Expression von miR156 wird hauptsächlich durch das Alter der Pflanze bestimmt und ist generell unabhängig von Photoperiode und Gibberellin (Galvão *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012a; Porri *et al.*, 2012). MiR172 steht hingegen unter photoperiodischer Kontrolle (Jung *et al.*, 2007). *GIGANTEA (GI)*, das unter induktiven Lichtbedingungen die Transkription von *CO* reguliert (Mizoguchi *et al.*, 2005), fördert zusätzlich die pri-miR172-Prozessierung unabhängig von *CO* (Jung *et al.*, 2007). Darüber hinaus könnten einige *MIR172*-Gene unter zirkadianer Kontrolle stehen (Nagel *et al.*, 2015), die miR172-Abundanz ändert sich im Tagesverlauf jedoch nicht (Jung *et al.*, 2007). Unter Kurztagbedingungen verringern *DELLA*-Proteine die miR172-Abundanz (Galvão *et al.*, 2012), miR172 wird also auch durch Gibberelline reguliert. Die Akkumulation von Zucker im Verlauf des Pflanzenwachstums induziert nicht nur die Expression von *FT* (King *et al.*, 2008), sondern inhibiert zudem die Expression der miR156-Primärtranskripte (Yang *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation des Signalmoleküls Trehalose-6-phosphat einen negativen Effekt auf die miR156-Abundanz hat, der von einer Zunahme von *SPL*-Transkripten begleitet wird (Wahl *et al.*, 2013).

Temperaturen von 16 °C im Vergleich zu 23 °C führen zu einer Erhöhung der Expression von *MIR156*-Genen, einer verringerten *SPL3*- und *SPL9*-Expression und zu einer Verlängerung der juvenilen Phase (Lee *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012a). Die Umgebungstemperatur beeinflusst zudem die pri-miR172-Prozessierung (die miR172-Abundanz ist bei 23 °C höher als bei 16 °C), auf die *MIR172*-Transkription hat sie wiederum keinen Einfluss (Jung *et al.*, 2012b). Erhöhte CO₂-Konzentrationen führen ebenfalls zu einer Reduktion der Expression von miR156 und miR157 und zu einer verstärkten Expression von miR172 und mehrerer *SPL*-Gene (May *et al.*, 2013).

Wu *et al.* (2009) konnten zeigen, dass miR172 *downstream* von miR156 agiert. *MIR172B* wird durch *SPL2*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13* und *SPL15* aktiviert (Abb. 4B) (Wu *et al.*, 2009; Hyun *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). AP2 bindet an die Promotoren von *MIR156*- und *MIR172*-Genen, um die Transkription zu fördern bzw. zu hemmen (Abb. 4B) (Yant *et al.*, 2010). Einige *MIR172*-Gene werden zudem in Abhängigkeit von AP2 durch die transkriptionellen Co-Repressoren LEUNG und SEUSS im äußeren Blütenwirtel reguliert (Abb. 4B) (Grigorova *et al.*, 2011).

Unter Langtagbedingungen aktivieren FT/FD und SOC1 die Expression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5*, unter Kurztagbedingungen induziert SOC1 ebenfalls die Expression der drei *SPL*-Gene, allerdings in Abhängigkeit von GA. Die transkriptionelle Regulation von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* erfolgt dabei unabhängig von miR156 (Jung *et al.*, 2012a). Interessanterweise induziert GA die Expression von *SPL3*, *SPL4*, *SPL5* sowie *SPL9* auch unter Langtagbedingungen, in diesem Fall allerdings nicht nur unabhängig von miR156, sondern auch von SOC1 (Galvão *et al.*, 2012; Porri *et al.*, 2012). GA beeinflusst aber nicht nur die Transkription von *SPL*-Genen. So konnte gezeigt werden, dass *SPL9* und *SPL15* durch DELLA-Proteine inaktiviert werden (Yu *et al.*, 2012; Hyun *et al.*, 2016).

Die Expression von *SPL3*, *SPL4*, *SPL5* ist in Mutanten der miR172-Zielgene und in miR172-Überexpressionspflanzen erhöht (Jung *et al.*, 2011). Da miR172 *FT* und *SOC1* in positiver Weise reguliert, indem sie dem supprimierenden Effekt ihrer Zielgene auf die *FT*- und *SOC1*-Expression entgegenwirkt, wird spekuliert, ob die Aktivierung von *SPL3*, *SPL4*, *SPL5* durch miR172 in Abhängigkeit der beiden Blühintegratoren geschieht (Teotia & Tang, 2015).

Im Gegensatz zu den anderen miR172-Zielgenen steigt die Expression von *TOE3* mit zunehmendem Pflanzenalter an (Jung *et al.*, 2007), was eine weitere Regulation des Gens unabhängig von miR172 nahelegt. Außerdem ist *TOE3* das bisher einzige miR172-Zielgen, für dessen Überexpression kein verspäteter Blühbeginn dokumentiert ist (Aukerman & Sakai, 2003; Jung *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2009; 2014). Jung *et al.* konnten zeigen, dass *SPL3* die *TOE3*-Expression durch direkte Bindung an den Promotor aktiviert (Jung *et al.*, 2014). Beide Gene sind interessanterweise an der Blütenentwicklung beteiligt, die Expression miRNA-resistenter Varianten der beiden Gene (*rSPL3*, *rTOE3*) führt zu starken Blütendefekten (Gandikota *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2007; 2014).

1.3.3. Verbindungen zwischen Cytokinin und dem *age pathway*

Cytokinin beeinflusst ebenso wie der *age pathway* die Blattbildungsrate (Werner *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2004; Hutchison *et al.*, 2006; Miyawaki *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006; Tokunaga *et al.*, 2012; Kiba *et al.*, 2013), die Zellgröße (Werner *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006; Holst *et al.*, 2011; Jensen, 2013) und die Anzahl juveniler Rosettenblätter (Kiba *et al.*, 2013) sowie das Blühverhalten, allerdings hauptsächlich unter Kurztagbedingungen und durch Induktion von *TSF* statt *FT* (s. Abschnitt 1.1.3). Allerdings nimmt Cytokinin auch Einfluss auf die Expression von Blühgenen, die auch vom *age pathway* beeinflusst werden, wie *AP1* und *SOC1* (D'Aloia *et al.*, 2011).

Genetische Interaktionen zwischen dem Cytokininmetabolismus/-signalweg und Komponenten des *age pathways* sind ebenfalls dokumentiert. SMZ bindet in einem Chromatinimmunopräzipitation(ChIP)-Chip-Experiment an die Promotoren von *CKX5* und *ARR3* (Mathieu *et al.*, 2009) und beeinflusst die Expression eines pARR6:LUC-Reporters in einem induzierbaren cDNA-Überexpressionssystem mit Keimlingen (Hellmann, 2013). Darüber hinaus konnten Liu *et al.* (2009b) zeigen, dass sich die miR172-Expression nach Cytokininbehandlung von Reiskeimlingen verringerte. *Arabidopsis*-Expressionsdaten von Brenner *et al.* (2005) und Bhargava *et al.* (2013) zeigen zudem einen Einfluss von Cytokinin auf mehrere Zielgene der miRNAs miR156 und miR172. Interessanterweise wird hier ein positiver Effekt von Cytokinin auf die Transkription von miR172-Zielgenen deutlich, während miR156-Zielgene von Cytokinin negativ reguliert werden.

Der bisher überzeugendste Beweis eines Einflusses von Cytokinin auf den *age pathway* stammt von Zhang *et al.* (2015c). Sie konnten zeigen, dass SPLs mit Typ-B-ARRs interagieren und deren Fähigkeit inhibieren, die Expression von Cytokininantwortgenen zu aktivieren, wodurch sich mit zunehmendem Alter der Pflanze die regenerative Kapazität verringert.

Auch auf der Ebene der Regulation der zirkadianen Uhr lässt sich eine Verbindung zwischen Cytokinin und dem *age pathway* herstellen. Wie bereits erwähnt, untersteht miR172 photoperiodischer Kontrolle (Jung *et al.*, 2007). Mithilfe von ChIP-Analysen konnten Nagel *et al.* (2015) zeigen, dass der MYB-like-Transkriptionsfaktor CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1), der eine wichtige Funktion bei der Regulation des zirkadianen Rhythmus spielt, an die Promotoren von *MIR172A* und *MIR172B*, *SMZ*, *SNZ*, *TOE1* und *TOE2* sowie *SPL9* bindet. Auch die Promotoren von Typ-A-ARR- und *CKX*-Genen werden von CCA1 gebunden. Silvia Nitschke (2014) zeigte wiederum in ihrer Doktorarbeit, dass veränderte Tag-Nacht-Rhythmen die zirkadiane Uhr cytokinindefizienter Pflanzen erheblich stören, was mit einer verringerten Expression von *CCA1* und weiterer Regulatoren der zirkadianen Uhr einhergeht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eindeutige Hinweise existieren, dass Cytokinin mit dem *age pathway* interagiert, wenngleich sich diese teilweise zu widersprechen scheinen. Da die einzelnen Komponenten des *age pathways* aber von verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren sowie auf unterschiedlichen Ebenen (transkriptionell, posttranskriptionell, translational, posttranslational)

reguliert werden, könnte sich der Einfluss von Cytokinin ebenso komplex darstellen und z. B. abhängig von Gewebe und Entwicklungsstadium sein.

1.4. Vorarbeiten und Zielsetzung

Um neue Funktionen des Phytohormons Cytokinin oder neue Aspekte bereits bekannter Funktionen in *Arabidopsis thaliana* aufzudecken, wurden transgene Linien generiert, die cytokininassoziierte Gene (*LOG4*, *ARR1-SRDX*, *CKX1*) unter der Kontrolle verschiedener Promotoren exprimieren. Mittels lokaler Veränderung des Cytokininstatus sollte die Auswirkung der Manipulation von Cytokininspiegel und -signaltransduktion in spezifischen Domänen, Geweben oder ganzen Organen auf Pflanzenwachstum und -entwicklung untersucht werden. Im Fokus stand dabei zunächst vor allem die Untersuchung von Expressionsdomänen, die autonome und nicht-autonome Wirkungen von Cytokinin auf das Sprossapikalmeristem (SAM) aufzeigen könnten. Elisabeth Otto (2013) verfolgte in ihrer Doktorarbeit bereits einen ähnlichen Ansatz und kombinierte *rock2*, *ARR1-SRDX* und *CKX1* mit Promotoren, die im SAM-Zentrum aktiv sind (*pCLV1*, *pCLV3*, *pWUS*). Während Cytokinindefizienz in den Expressionsdomänen von *CLV1*, *CLV3* und *WUS* kaum Änderungen des Phänotyps hervorriefen, führte die Etablierung eines konstitutiven Cytokininsignals durch Expression von *rock2* zu vergrößerten Meristemen und zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Zellteilung und -differenzierung (Otto, 2013). Darüber hinaus ließen die Auswirkungen der Expression von *CKX3* unter der Kontrolle des primordienspezifischen Promotors *pANT* einen nicht-autonomen Effekt des Cytokiningehalts in Organprimordien auf die SAM-Aktivität vermuten (Holst *et al.*, 2011).

Für diese Arbeit wurden Promotoren ausgesucht, die beispielsweise die Wichtigkeit von Cytokinin bei der Abgrenzung sich entwickelnder Organe vom Rest des SAMs (*pCUC3*) oder den Einfluss des Cytokininstatus im Prokambium auf das darüberliegende SAM (*pHB8*) aufzeigen könnten. Als interessanteste Pflanzengruppe stellte sich allerdings diejenige heraus, die unter Nutzung des *ATML1*-Promotors einen veränderten Cytokininstatus in der Epidermis aufwies. Da eine detaillierte Analyse aller transgenen Linien im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können, wurde entschieden, den Fokus auf die Untersuchung der *pATML1*-Linien zu legen.

Die Analyse der *pATML1*-Linien ließ zum einen eine wichtige Rolle von Cytokinin in der Epidermis bei der Determination der Organgröße vermuten. Zum anderen deutete sich eine bisher unbekannt Funktion von Cytokinin als Regulator des Übergangs von der juvenilen in die adulte vegetative Entwicklungsphase an. Der Untersuchung des Einflusses von Cytokinin auf Entwicklungsübergänge ist der zweite Teil dieser Arbeit gewidmet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Internetressourcen und Software

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme, Internetdatenbanken und Internet-Tools sind in Tab. 1 gelistet.

Tab. 1: Verwendete Computerprogramme und Internetressourcen.

Name	Hersteller, Referenz, Internetlink	Verwendung
Applied Biosystems 7500 Software v2.0.6	Applied Biosystems/Life Technologies	Quantitative RT-PCR
AxioVision Rel. 4.6	Zeiss	Digitalfotografie am Lichtmikroskop
CorelDRAW X6	Corel Corporation	Bildbearbeitung, Erstellung von Abbildungen
The DIURNAL project	http://diurnal.mocklerlab.org/ , Mockler <i>et al.</i> (2007)	Microarraydaten diurnal regulierter Gene
DoubleDigest™	Fermentas/Thermo Scientific	Suche nach geeigneten Restriktionsenzymen für Doppelverdaue
EndNote	Thomson Reuters	Verwalten von Publikationen und Quellangaben
GeneCapture 7.12	VWR	Geldokumentation
GeneSnap 7.12	SynGene	Geldokumentation
ImageJ	Abràmoff <i>et al.</i> (2004)	Bildanalyse
NASC	The European Arabidopsis Stock Centre (http://arabidopsis.info/)	Bestellung von <i>Arabidopsis</i> -Samen
NCBI	The National Center for Biotechnology Information (http://ncbi.nlm.nih.gov/)	Literatur (PubMed), Primerdesign (Primer-BLAST)
NetPrimer	PREMIER Biosoft	Überprüfung der Primerqualität
Office Excel 2010	Microsoft	Berechnungen, Erstellung von Diagrammen
Office PowerPoint 2010	Microsoft	Erstellung von Abbildungen
Olympus cellSens	Olympus Life Science	Digitalfotografie am Stereomikroskop
Photoshop CS4	Adobe	Bildbearbeitung
TAIR	The Arabidopsis Information Resource (http://arabidopsis.org)	<i>Arabidopsis</i> -Internetdatenbank
TOUCAN3	Aerts <i>et al.</i> (2005)	Suche nach regulatorischen Sequenzmotiven in Promotorbereichen
VectorNTI Suite 9	Invitrogen/Life Technologies	<i>In-silico</i> -Sequenzanalysen (Klonierungen, Primer, Restriktionsverdaue, Sequenzvergleiche, Sequenzierungen)

2.1.2. Analysesets (Kits)

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits können Tab. 2 entnommen werden.

Tab. 2: Verwendete Kits.

Name	Hersteller und Katalognummer	Verwendung
GENECLEAN II Kit	MP Biomedicals (Santa Ana, CA), Kat.-Nr. 111001400	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Stratec (Birkenfeld, D), Kat.-Nr. 1010140300	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel (Düren, D), Kat.-Nr. 740609.250	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder von PCR-Produkten
NucleoSpin Plasmid EasyPure	Machery-Nagel (Düren, D), Kat.-Nr. 740727.250	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>
NucleoSpin RNA Plant	Machery-Nagel (Düren, D), Kat.-Nr. 740949.250	Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Pflanzenmaterial
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden, D), Kat.-Nr. 74904	Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Pflanzenmaterial

2.1.3. Enzyme

In Tab. 3 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgelistet.

Tab. 3: Verwendete Enzyme.

Name	Hersteller und Katalognummer	Verwendung
DNase I, RNase-free	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham, MA), Kat.-Nr. EN0521	DNA-Verdau nach RNA-Extraktion
Immolase™ DNA Polymerase	Bioline (Luckenwalde, D), Kat.-Nr. BIO-21047	qRT-PCR
Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA), Kat.-Nr. 11789013	Klonierungen
Gateway® BP Clonase® II Enzyme Mix	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA), Kat.-Nr. 11789020	Klonierungen
Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA), Kat.-Nr. 11791019	Klonierungen
Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA), Kat.-Nr. 11791020	Klonierungen
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham, MA), Kat.-Nr. F530S	Klonierungs-PCRs
Restriktionsendonukleasen	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham, MA)	Restriktionsverdau bei Genotypisierungen (CAPS-Marker), Klonierungen
RNase A	Boehringer/Roche (Rotkreuz, CH), Kat.-Nr. 10109142001	Plasmid-Minipräparation
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA), Kat.-Nr. 10777019	RNase-Inhibitor bei <i>Stem-loop</i> -cDNA- Synthese
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA), Kat.-Nr. 18080-044	cDNA-Synthese
Taq-DNA-Polymerase, rekombinant	AG Schuster, Institut für Biologie: Angewandte Genetik, FU Berlin	PCR-Analysen

2.1.4. Chemikalien und Oligonukleotide

Alle verwendeten Laborchemikalien und -lösungsmittel besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt, D), BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), Berkel AHK (Ludwigshafen, D), Bionline (Luckenwalde, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt, D), MP Biomedicals (Santa Ana, CA), Rapidozym (Berlin, D) und Sigma-Aldrich (München, D) verwendet. Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA) synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

2.1.5. Nährmedien, Antibiotika, Herbizide und Aminosäuren

In Tab. 4 ist die Zusammensetzung der genutzten Bakterienmedien angegeben. Für die Anzucht von *E. coli* auf Fest- oder in Flüssigkultur wurde vor allem LB-Medium eingesetzt. SOB- und *Low-salt*-LB-Medium wurden bei der Herstellung kompetenter *E.-coli*-Zellen verwendet (s. Abschnitte 2.2.1.1 und 2.2.1.3). SOC-Medium wurde stets für die Erholung transformierter *E.-coli*-Zellen benutzt (s. Abschnitte 2.2.1.2 und 2.2.1.4).

Agrobacterium tumefaciens wurde entweder auf LB-Festmedium oder in YEB-Flüssigkultur angezogen. Bei der Herstellung elektrokompenter Zellen (s. Abschnitte 2.2.1.5) und nach der Transformation von *A.-tumefaciens*-Zellen (s. Abschnitte 2.2.1.6) wurde YEB-Medium eingesetzt.

Tab. 4: Nährmedien für Bakterien.

Medium	Zusammensetzung
<i>Low-salt lysogeny broth</i> (LS-LB) (Bertani, 1951)	1,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 mit NaOH; in ddH ₂ O
<i>Lysogeny broth</i> (LB) (Bertani, 1951)	1,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1,0 % (w/v) NaCl; Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 mit NaOH; für Festmedium Zugabe von 1,5 % Agar; in ddH ₂ O
<i>Super optimal broth</i> (SOB) (Hanahan, 1983)	2,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit NaOH; nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 mM MgCl ₂ und 10 mM MgSO ₄ ; in ddH ₂ O
<i>Super optimal broth with catabolite repression</i> (SOC) (Hanahan, 1983)	2,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit NaOH; nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ und 20 mM Glucose; in ddH ₂ O
<i>Yeast extract broth</i> (YEB) (Verviet et al., 1975)	0,5 % (w/v) Fleischextrakt; 0,1 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 2 mM MgSO ₄ ; Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 mit NaOH; in ddH ₂ O

Die für die Selektion erfolgreich transformierter Bakterienzellen verwendeten Antibiotika und deren Konzentration im Medium sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Antibiotika für die Selektion von Bakterien und deren Konzentration im Medium.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin (Amp)*	100 mg/ml; in ddH ₂ O	100 µg/ml
Carbenicillin (Carb)*	50 mg/ml; in ddH ₂ O	50 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	34 mg/ml; in 100 % EtOH	34 µg/ml
Gentamycin (Gent)*	25 mg/ml; in ddH ₂ O	25 µg/ml
Kanamycin (Kan)*	50 mg/ml; in ddH ₂ O	50 µg/ml
Nalidixin (Nal)	20 mg/ml; in Chloroform	20 µg/ml
Rifampicin (Rif)	50 mg/ml; in DMSO	50 µg/ml
Spectinomycin (Spec)*	50 mg/ml; in ddH ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml; in 100 % EtOH	10 µg/ml

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert (*) oder blieben unfiltriert und wurden bei -20 °C gelagert. Die Antibiotika wurden dem autoklavierten Medium vor Gebrauch in den angegebenen Konzentrationen zugegeben.

Für die Hefeanzucht wurden die in Tab. 6 angegebenen Nährmedien verwendet. Die in Tab. 7 aufgelisteten Aminosäuren wurden dem SD-Medium beigefügt, das stets für die Selektion erfolgreich transformierter Hefezellen genutzt wurde.

Tab. 6: Nährmedien für Hefen.

Medium	Zusammensetzung
<i>Yeast extract peptone dextrose</i> (YPD) (Ausubel <i>et al.</i> , 1994)	1,0 % (w/v) Hefeextrakt; 2,0 % (w/v) Pepton; 2,0 % (w/v) Glucose; für Festmedium Zugabe von 2,0 % (w/v) Agar; in ddH ₂ O
<i>Synthetic defined</i> (SD) (Rose <i>et al.</i> , 1990)	0,67 % (w/v) <i>Yeast nitrogen base</i> ohne Aminosäuren; 2,0 % (w/v) Glucose; Einstellen des pH-Wertes auf 6,0 mit KOH; für Festmedium Zugabe von 2,0 % (w/v) Agar; in ddH ₂ O

Tab. 7: Verwendete Aminosäuren und deren Konzentration im SD-Medium.

Aminosäure	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Histidin (His)	0,2 %; in ddH ₂ O	0,002 %
Leucin (Leu)	1,0 %; in ddH ₂ O	0,01 %
Tryptophan (Trp)	0,35 %; in ddH ₂ O	0,0035 %
Uracil (Ura)	0,2 % (pH 8,0); in ddH ₂ O	0,002 %

Die Aminosäure-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bis auf Uracil bei 4-8 °C gelagert. Die Aminosäuren wurden dem autoklavierten SD-Medium (Tab. 6) vor Gebrauch in den angegebenen Konzentrationen zugegeben.

In Tab. 8 sind die verwendeten Pflanzenmedien angegeben. Für Segregationsanalysen transgener Pflanzenlinien wurde hauptsächlich Ats-Festmedium benutzt, gelegentlich wurde aber auch $\frac{1}{2}$ -MS-Medium mit 1 % (w/v) Saccharose verwendet. Dabei kamen die in Tab. 9 aufgeführten Antibiotika und Herbizide zum Einsatz. Für den Cafenstrol-Versuch (s. Abschnitt 2.2.3.5) wurde Ats-Medium verwendet. Der Induktionsversuch (s. Abschnitt 2.2.3.10) wurde mit $\frac{1}{2}$ -MS-Medium mit 0,1 % (w/v) Saccharose durchgeführt. Bei der Untersuchung des Wurzelwachstums (s. Abschnitt 2.2.3.6) kam $\frac{1}{2}$ -MS-Medium mit 1 % (w/v) Saccharose zum Einsatz.

Tab. 8: Nährmedien für Pflanzen.

Medium	Zusammensetzung
<i>Arabidopsis thaliana</i> salts Medium (Ats) (Estelle & Somerville, 1987)	5 mM KNO ₃ ; 2,5 mM KPO ₄ (pH 5,5); 2 mM MgSO ₄ ; 2 mM Ca(NO ₃) ₂ ; 50 µM Fe-EDTA; 70 µM H ₃ BO ₃ ; 14 µM MnCl ₂ ; 0,5 µM CuSO ₄ ; 1 µM ZnSO ₄ ; 200 nM Na ₂ MoO ₄ ; 10 µM NaCl; 10 nM CoCl ₂ ; 0,5 % (w/v) Saccharose; für Festmedium Zugabe von 0,8 % (w/v) Agar; in ddH ₂ O
$\frac{1}{2}$ Murashige-Skoog-Medium ($\frac{1}{2}$ MS) (Murashige & Skoog, 1962)	0,22 % (w/v) MS-Salze; 0,05 % (w/v) MES; 1 % bzw. 0,1 % (w/v) Saccharose; Einstellen des pH-Wertes auf 5,7; für Festmedium Zugabe von 0,8 % (w/v) Agar; in ddH ₂ O

Tab. 9: Verwendete Antibiotika und Herbizide für die Selektion von *Arabidopsis-thaliana*-Pflanzen und deren Konzentration im Pflanzenmedium.

Antibiotikum bzw. Herbizid	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Hygromycin (Hyg)	50 mg/ml; in ddH ₂ O	15 µg/ml
Kanamycin (Kan)*	50 mg/ml; in ddH ₂ O	30 µg/ml
Phosphinothricin (PPT)*	10 mg/ml; in ddH ₂ O	10 µg/ml

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert (*) oder blieben unfiltriert und wurden bei -20 °C (*) bzw. 4-8 °C gelagert. Die Antibiotika wurden dem autoklavierten Medium vor Gebrauch in den angegebenen Konzentrationen zugegeben.

2.1.6. Mikroorganismen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Bakterienstämme und ein Hefestamm verwendet (Tab. 10). Die *Escherichia-coli*-Stämme DH5α und DH10B wurden für die Replikation von Vektoren genutzt, mit Ausnahme der Gateway®-Leervektoren, für deren Vermehrung aufgrund des enthaltenen *ccdB*-Gens die Nutzung des DB3.1-Stammes nötig war. Das Wachstum der *E.-coli*-Zellen erfolgte standardmäßig bei 37 °C.

Für die transiente Proteinexpression in *Nicotiana benthamiana* (s. Abschnitt 2.2.3.1) und die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* (s. Abschnitt 2.2.3.2) wurde der *Agrobacterium-tumefaciens*-Stamm GV3101::pMP90 verwendet. Bei der transienten Expression in *N.-benthamiana*-Blättern kam zudem der Stamm C58C1(pCH32) zum Einsatz, um mittels Expression des p19-Proteins die post-

transkriptionelle Genabschaltung zu unterdrücken. Der *A. tumefaciens*-Stamm AGL-1 wurde für die stabile Transformation von *A. thaliana* mit den Zielgen-Mimikry-Konstrukten *p35S:MIM156* und *p35S:MIM172* genutzt. *A. tumefaciens*-Zellen wurden stets bei 28 °C inkubiert.

Der *Yeast-one-hybrid*-Matrixansatz wurde im *Saccharomyces-cerevisiae*-Stamm L40ccua durchgeführt. Die Hefeanzucht erfolgte stets bei 30 °C.

Tab. 10: Verwendete Bakterien- und Hefestämme.

Spezies	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AGL-1	pTiBo542ΔT-DNA; Rif ^R , Carb ^R	Lazo <i>et al.</i> (1991)
	C58C1(pCH32)	Rif ^R , Tet ^R	Voinnet <i>et al.</i> (2003)
	GV3101::pMP90	pMP90 (pTiC58ΔT-DNA); Rif ^R , Gent ^R	Koncz & Schell (1986)
<i>Escherichia coli</i>	DB3.1	F ⁻ <i>gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1</i>	Hanahan (1983), Bernard & Couturier (1992)
	DH5α	F ⁻ Φ80Δ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)-U169 <i>endA1 recA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 deoR nupG hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) λ⁻</i>	Grant <i>et al.</i> (1990)
	DH10B	F ⁻ Φ80Δ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 endA1 recA1 galU galk nupG rpsL araD139 Δ(ara, leu)7697 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC) λ⁻</i>	Grant <i>et al.</i> (1990)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L40ccua	<i>MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop)₄-HIS3 ura3::(lexAop)₈-lacZ ADE2::(lexAop)₈-URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2</i>	Goehler <i>et al.</i> (2004)

2.1.7. Vektoren

In Tab. 11 und Tab. 12 sind die in dieser Arbeit verwendeten bzw. generierten Plasmide mit ihren Selektionsmarkern aufgelistet. Die pACT2-GW- und pHISi-1(-GW)-Vektoren wurden beim *Yeast-one-Hybrid*-Matrixansatz eingesetzt. Als binäre Plasmide für die bakterielle und pflanzliche Transformation wurden pB7m34GW, pGREEN und pKGWFS7 verwendet. pSoup diente als Helferplasmid für die Replikation von pGREEN. Für die Zwischenklonierung von Promotor-, Gen- und *Tag*-Sequenzen wurden die Vektoren pDONRTMP4-P1R, pDONRTM221 und pDONRTMP2R-P3 genutzt. Vektorkarten der Ausgangsplasmide sind im Anhang zu finden. Sequenzierungen klonierter DNA-Fragmente wurden von GATC Biotech (Konstanz, D) durchgeführt.

Tab. 11: Verwendete Plasmide.

Vektor	Selektionsmarker		Referenz
	in Bakterien	in Hefen in Pflanzen	
pACT2-GW/ARR1	Amp ^R /Carb ^R	Leu -	Dortay <i>et al.</i> (2006)
pACT2-GW/ARR10	Amp ^R /Carb ^R	Leu -	Dortay <i>et al.</i> (2006)
pACT2-GW/ARR11	Amp ^R /Carb ^R	Leu -	Dortay <i>et al.</i> (2006)
pACT2-GW/ARR12	Amp ^R /Carb ^R	Leu -	Takeshi Mizuno
pACT2-GW/ARR14	Amp ^R /Carb ^R	Leu -	Dortay <i>et al.</i> (2006)
pACT2-GW/ARR18	Amp ^R /Carb ^R	Leu -	Takeshi Mizuno
pACT2-GW/ARR2	Amp ^R /Carb ^R	Leu -	Dortay <i>et al.</i> (2006)
pACT2-GW/C115	Amp ^R /Carb ^R	Leu -	Dortay <i>et al.</i> (2006)
pB7m34GW	Spec ^R , Cm ^R	- Basta ^R /PPT ^R	Karimi <i>et al.</i> (2005)
pBINHygTx/p35S:CKX1	Kan ^R	- Hyg ^R	Werner <i>et al.</i> (2001)
pDONR TM 221	Kan ^R , Cm ^R	-	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA)
pDONR TM P2R-P3/4xMyc	Kan ^R	-	Klaas Wulfetange
pDONR TM P4-P1R	Kan ^R	-	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA)
pDONR TM P4-P1R/p35S	Kan ^R	-	Otto (2013)
pGREEN/p35S:MIM156	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R	Todesco <i>et al.</i> (2010)
pGREEN/p35S:MIM172	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R	Todesco <i>et al.</i> (2010)
pHISi-1/pARR6(220 bp)	Amp ^R /Carb ^R	His -	Pfeifer (2012)
pHISi-1-GW	Amp ^R /Carb ^R , Cm ^R	His -	Alexandre <i>et al.</i> (1993), Pfeifer (2012)
pHISi-1-GW/C115	Amp ^R /Carb ^R	His -	Pfeifer (2012)
pKGWFS7	Spec ^R , Cm ^R	- Kan ^R	Karimi <i>et al.</i> (2002)
pSoup	Tet ^R	-	Hellens <i>et al.</i> (2000)

Tab. 12: In dieser Arbeit generierte Plasmide.

Vektor	Selektionsmarker	
	in Bakterien	in Hefen in Pflanzen
pB7m34GW/p35S:ARR1-SRDX-4xMyc	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/p35S:CKX1-4xMyc	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/p35S:LOG4	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/pATML1:CKX1-4xMyc	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/pATML1:LOG4	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/pMIR165A:ARR1-SRDX-4xMyc	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/pMIR165A:CKX1-4xMyc	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/pMIR165A:LOG4	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/pPDF1:ARR1-SRDX-4xMyc	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/pPDF1:CKX1-4xMyc	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pB7m34GW/pPDF1:LOG4	Spec ^R	- Basta ^R /PPT ^R
pDONR TM 221/ARR1-SRDX(w/o Stopp)	Kan ^R	- -
pDONR TM 221/CKX1(w/o Stopp)	Kan ^R	- -
pDONR TM 221/LOG4(w/ Stopp)	Kan ^R	- -
pDONR TM 221/pATML1	Kan ^R	- -
pDONR TM 221/pMIR165A	Kan ^R	- -
pDONR TM 221/pMIR172B	Kan ^R	- -
pDONR TM 221/pMIR172D	Kan ^R	- -
pDONR TM 221/pMIR172E	Kan ^R	- -
pDONR TM 221/pPDF1	Kan ^R	- -
pDONR TM P4-P1R/pATML1	Kan ^R	- -
pDONR TM P4-P1R/pMIR165A	Kan ^R	- -
pDONR TM P4-P1R/pPDF1	Kan ^R	- -
pHISi-1-GW/pMIR172B	Amp ^R /Carb ^R	His -
pHISi-1-GW/pMIR172D	Amp ^R /Carb ^R	His -
pHISi-1-GW/pMIR172E	Amp ^R /Carb ^R	His -
pKGWFS7/pATML1:GFP-GUS	Spec ^R	- Kan ^R
pKGWFS7/pMIR165A:GFP-GUS	Spec ^R	- Kan ^R
pKGWFS7/pPDF1:GFP-GUS	Spec ^R	- Kan ^R

2.1.8. Pflanzenmaterial

2.1.8.1. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) gehört zur Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler) und wurde für den Großteil der Untersuchungen genutzt. In allen Experimenten wurden Pflanzen des Ökotyps Columbia-0 (Col-0; Originalquelle: J. Dangl, *University of North Carolina*, Chapel Hill, NC) als Wildtyp-Kontrolle verwendet. Darüber hinaus wurden verschiedene Mutanten und transgene Linien verwendet, die entweder vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC, <http://arabidopsis.info>, Scholl *et al.* (2000)) oder von den angegebenen Quellen bezogen wurden (Tab. 13). Weitere transgene Linien und Mutanten wurden durch Transformation bzw. Kreuzen hergestellt (Tab. 14).

Tab. 13: Verwendete Mutanten und transgene Linien.

Pflanzenlinie	Abkürzung in dieser Arbeit	NASC-ID	Referenz
<i>ahk2-2tk ahk3-3</i>	<i>ahk2 ahk3</i>	-	Higuchi <i>et al.</i> (2004)
<i>arr1-3 arr10-5</i>	<i>arr1 arr10</i>	-	Argyros <i>et al.</i> (2008)
<i>arr1-3 arr12-1</i>	<i>arr1 arr12</i>	-	Mason <i>et al.</i> (2005)
<i>arr10-5 arr12-1</i>	<i>arr10 arr12</i>	-	Argyros <i>et al.</i> (2008)
<i>ckx3-S1 ckx4-S1 ckx5-S1 ckx6-S2</i>	<i>ckx3,4,5,6</i>	-	Bartrina (2006)
<i>cre1-12 ahk2-2tk</i>	<i>cre1 ahk2</i>	-	Higuchi <i>et al.</i> (2004)
<i>cre1-12 ahk3-3</i>	<i>cre1 ahk3</i>	-	Higuchi <i>et al.</i> (2004)
<i>ipt3-2 ipt5-2 ipt7-1</i>	<i>ipt3 ipt5 ipt7</i>	-	Miyawaki <i>et al.</i> (2006)
p35S:CKX1 ^(a)	-	-	Werner <i>et al.</i> (2003)
pANT:CKX3-GFP ^(b)	pANT:CKX3	-	Holst <i>et al.</i> (2011)
pSPL9:GFP-rSPL9	rSPL9	N9954	Wang <i>et al.</i> (2009)
<i>rock2</i>	-	-	Bartrina (2006), Jensen (2013)
<i>rock3</i>	-	-	Bartrina (2006), Jensen (2013)
<i>smz-4</i>	<i>smz</i>	N664087 (SALK_135824C)	diese Arbeit
<i>spl9-4 spl15-1</i>	<i>spl9 spl15</i>	N67865	Wu <i>et al.</i> (2009)
<i>toe3-2</i>	<i>toe3</i>	N860248 (SAIL_74_B10)	Jung <i>et al.</i> (2007; 2014)

Der genetische Hintergrund aller Linien ist Col-0.

(a) entspricht Linie #6 aus Holst *et al.* (2011). (b) entspricht Linie #11 aus Werner *et al.* (2003).

Für den Großteil der Experimente wurden die verwendeten *Arabidopsis-thaliana*-Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) angezogen, einige Untersuchungen wurden aber auch unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) durchgeführt. Die Pflanzenanzucht erfolgte bei 22 °C, Luftfeuchtigkeiten von 30-65 % und Lichtintensitäten von 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Gewächshaus (Basta-Selektion, genetische Kreuzungen, Genotypisierungen, Samenertragsanalysen, Vermehrung, Pflanzenanzucht für Gewebe-Einbettung, GUS-Färbung, Phytohormonmessungen, Transkriptanalysen), im Kulturraum (Cafenstrol-Versuch, Segregationsanalysen, Wurzelanalysen), in der Klimakammer (Phäno-

typisierungen, Pflanzenanzucht für Transkriptanalysen) und in Phytoschränken (Induktionsversuch, Phänotypisierungen).

Tab. 14: In dieser Arbeit generierte Pflanzenlinien.

Pflanzenlinie	Abkürzung in dieser Arbeit
<i>ahk2-2tk ahk3-3</i> p35S:MIM156	<i>ahk2 ahk3</i> MIM156
<i>ahk2-2tk ahk3-3</i> p35S:MIM172	<i>ahk2 ahk3</i> MIM172
<i>ahk2-2tk ahk3-3</i> pATML1:LOG4	<i>ahk2 ahk3</i> AL
<i>ahk2-2tk ahk3-3</i> pSPL9:GFP-rSPL9	<i>ahk2 ahk3</i> rSPL9
<i>ahk2-2tk ahk3-3 smz-4</i>	<i>ahk2 ahk3 smz</i>
<i>ahk2-2tk ahk3-3 spl9-4 spl15-1</i>	<i>ahk2 ahk3 spl9 spl15</i>
<i>ahk2-2tk ahk3-3 toe3-2</i>	<i>ahk2 ahk3 toe3</i>
<i>arr1-3 arr10-5</i> pATML1:LOG4	<i>arr1 arr10</i> AL
<i>arr1-3 arr12-1</i> pATML1:LOG4	<i>arr1 arr12</i> AL
<i>arr10-5 arr12-1</i> pATML1:LOG4	<i>arr10 arr12</i> AL
<i>cre1-12 ahk2-2tk</i> pATML1:LOG4	<i>cre1 ahk2</i> AL
<i>cre1-12 ahk3-3</i> pATML1:LOG4	<i>cre1 ahk3</i> AL
p35S:ARR1-SRDx-4xMyc	35AS
p35S:LOG4	35L
p35S:MIM156*	MIM156
p35S:MIM172*	MIM172
pATML1:ARR1-SRDx-4xMyc	AAS
pATML1:CKX1-4xMyc	AC
pATML1:GFP-GUS	-
pATML1:LOG4	AL
pATML1:LOG4 pATML1:ARR1-SRDx-4yMyc	AL AAS
pMIR165A:CKX1-4xMyc	MC
pMIR165A:GFP-GUS	-
pMIR165A:LOG4	ML
pPDF1:CKX1-4xMyc	PC
pPDF1:GFP-GUS	-
pPDF1:LOG4	PL
<i>rock2</i> p35S:MIM156	<i>rock2</i> MIM156
<i>rock2</i> p35S:MIM172	<i>rock2</i> MIM172
<i>rock2</i> pSPL9:GFP-rSPL9	<i>rock2</i> rSPL9
<i>rock2 smz-4</i>	<i>rock2 smz</i>
<i>rock2 spl9-4 spl15-1</i>	<i>rock2 spl9 spl15</i>
<i>rock2 toe3-2</i>	<i>rock2 toe3</i>

Der genetische Hintergrund aller Linien ist Col-0.

* Bakterienklone wurden vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center bezogen (pGREEN/p35S:MIM156, NASC-ID: N9953, Franco-Zorrilla *et al.* (2007); pGREEN/p35S:MIM172, NASC-ID: N783241, Todesco *et al.* (2010)), die Plasmid-DNA isoliert und mittels *A. tumefaciens* in Col-0 transformiert; mittels quantitativer RT-PCR wurde in der T1-Generation jeweils die Linie mit der stärksten Expression identifiziert, die dann für Kreuzungen und als Kontrolllinie verwendet wurde.

Anzucht auf Erde

Arabidopsis-Samen wurden gleichmäßig auf feuchte „Anzuchterde“ (T-Erde:P-Erde:Sand, 2:2:1) gestreut, für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend ins Licht gestellt. Für die ersten paar Tage wurden

die Pflanzenschalen mit einer durchsichtigen Plastikhaube bedeckt, um die keimenden Samen vor Austrocknung zu schützen. Nach zehn bis zwölf Tagen wurden die Pflanzen vereinzelt und dabei in Erde gesetzt, die Peligran G statt Sand enthielt (T-Erde:P-Erde:Peligran, 2:2:1). Nach dem Umsetzen der Keimlinge wurden sie wiederum mit einer Haube bedeckt, die nach drei Tagen entfernt wurde.

In-vitro-Kultur

Die Anzucht unter sterilen Bedingungen erfolgte auf Festmedium (Ats oder $\frac{1}{2}$ MS, Tab. 8) oder in Flüssigkultur ($\frac{1}{2}$ MS, Tab. 8). Dafür wurden die Samen zunächst sterilisiert (s. Abschnitt 2.2.3.4), auf Fest- oder Flüssigmedium verteilt, für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend ins Licht gestellt. Bei Segregationsanalysen wurden die Keimlinge nach zehn bis zwölf Tagen auf Erde (T-Erde:P-Erde:Peligran, 2:2:1) umgesetzt und für drei Tage mit einer durchsichtigen Plastikhaube bedeckt.

2.1.8.2. *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana gehört zur Familie der Solanaceae (Nachtschattengewächse) und wurde für die transiente Expression von *p35S:CKX1* und *p35S:CKX1:4xMyc* mittels *Agrobacterium tumefaciens* (s. Abschnitt 2.2.3.1) verwendet. Die *Nicotiana-benthamiana*-Pflanzen wurden auf Erde (T-Erde:P-Erde:Sand, 2:2:1) und bei Langtagverhältnissen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) im Gewächshaus angezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1. Herstellung chemokompetenter *Escherichia-coli*-Zellen

Die Herstellung chemokompetenter *E.-coli*-Zellen erfolgte nach Inoue *et al.* (1990). Aus einer Glycerin-Dauerkultur (s. Abschnitt 2.2.1.7) oder von einem frischen Ausstrich eines *E.-coli*-Stammes (Tab. 10) wurde eine 5-ml-Übernachtskultur (LB-Medium, Tab. 4) angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 2 ml in einen Schikanekolben mit 200 ml SOB-Medium (Tab. 4) überführt. Diese Hauptkultur wurde schüttelnd bei 28 °C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,4-0,5 angezogen, auf konische 50-ml-Röhrchen aufgeteilt und zum Abkühlen 10 min auf Eis inkubiert. Ab diesem Punkt wurde (mit Ausnahme des DMSO) ausschließlich mit vorgekühlten Materialien und Flüssigkeiten weitergearbeitet. Die Zellen wurden 20 min bei 2000 g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellpellets vorsichtig mit Hilfe einer Glaspipette in jeweils 4 ml sterilfiltriertem TP-Puffer (10 mM PIPES; 15 mM $CaCl_2$; 250 mM KCl; Einstellen des pH-Wertes auf 6,7 mit KOH; 55 mM

MnCl₂; in ddH₂O) resuspendiert und wieder vereinigt. Danach wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % hinzugefügt, während die Zellsuspension mit der Hand geschwenkt wurde. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Zellen in 200- μ l-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2. Transformation chemokompetenter *Escherichia-coli*-Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden 20 min auf Eis aufgetaut, die zu transformierende Plasmid-DNA hinzupipettiert und vorsichtig mit den Zellen gemischt. Nach einer weiteren Inkubation von 20 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C im Wasserbad. Danach wurden die Zellen sofort mit 800 μ l vorgewärmtem SOC-Medium (Tab. 4) gemischt und dann für 45-60 min bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Festmedium (Tab. 4) mit plasmidspezifischem Antibiotikum (Tab. 5, Tab. 11 und Tab. 12) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3. Herstellung elektrokompetenter *Escherichia-coli*-Zellen

Eine 5-ml-Kultur (LB-Medium, Tab. 4) wurde aus einer Glycerin-Dauerkultur (s. Abschnitt 2.2.1.7) oder von einem frischen Ausstrich des entsprechenden *E.-coli*-Stammes (Tab. 10) angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurde eine 250-ml-Hauptkultur (LS-LB-Medium, Tab. 4) angeimpft, die schüttelnd bei 37 °C inkubiert wurde, bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht wurde. Ab diesem Punkt wurden ausschließlich vorgekühlte Materialien und Flüssigkeiten verwendet. Die Zellen wurden in konischen 50-ml-Röhrchen abzentrifugiert (10 min, 4000 g, 4 °C) und nach Entfernen des Überstandes mit einer Glaspipette in jeweils 20 ml sterilem ddH₂O resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt und nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4000 g, 4 °C) wurden die Zellen in 20 ml zehnpromzentiger Glycerinlösung vereinigt. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert und schließlich in 5 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50- μ l-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.4. Transformation elektrokompetenter *Escherichia-coli*-Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen wurden zum Auftauen für 20 min auf Eis inkubiert und dann vorsichtig mit der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Nach einer weiteren Inkubation von 20 min auf Eis wurden die äußeren Metallplatten der Küvetten gründlich abgetrocknet und die Zellen im MicroPulserTM (Bio-Rad, München, D) mit 1,8 kV für 2-6 ms elektroporiert. Danach wurden die Zellen in der Küvette sofort mit 1 ml LB-Medium (Tab. 4) gemischt, in

ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 45-60 min bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Festmedium (Tab. 4) mit plasmidspezifischem Antibiotikum (Tab. 5, Tab. 11 und Tab. 12) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.5. Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium-tumefaciens*-Zellen

Aus einer Glycerin-Dauerkultur (s. Abschnitt 2.2.1.7) oder von einem frischen Ausstrich eines *A. tumefaciens*-Stammes (Tab. 10) wurde eine 5-ml-Übernachtkultur (YEB-Medium, Tab. 4) angeimpft und bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 2,5 ml in einen Erlenmeyerkolben mit 250 ml YEB-Medium (Tab. 4) überführt. Diese Hauptkultur wurde bei 28 °C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht war. Die folgenden Schritte erfolgten ausschließlich mit vorgekühlten Materialien und Flüssigkeiten. Die Flüssigkultur wurde auf konische 50-ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und die Zellen in der Zentrifuge (10 min, 4000 g, 4 °C) sedimentiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellpellets vorsichtig mit einer Glaspipette in jeweils 20 ml sterilem ddH₂O resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, die Zellen erneut abzentrifugiert (10 min, 4000 g, 4 °C) und in 20 ml einer zehnpromzentigen Glycerinlösung aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden dann in einem 50-ml-Röhrchen vereinigt und nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen schließlich in 5 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50- μ l-Portionen aliquotiert, welche sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurden.

2.2.1.6. Transformation elektrokompetenter *Agrobacterium-tumefaciens*-Zellen

Pro Transformationsansatz wurde ein Zellaliquot zum Auftauen für 20 min auf Eis inkubiert, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt und nach vorsichtigem Mischen in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Nachdem die Zellen für weitere 20 min auf Eis inkubiert worden waren, wurden die Metallplatten der Küvetten sorgfältig abgetrocknet und die Zellen im MicroPulserTM (BioRad, München, D) mit 2,4 kV für etwa 5 ms elektroporiert. Die Zellen wurden nach der Elektroporation sofort mit 1 ml YEB-Medium (Tab. 4) gemischt, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 28 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf selektivem LB-Festmedium (Tab. 4) ausplattiert und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.1.7. Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Zur Herstellung einer Glycerin-Dauerkultur von *E. coli* oder *A. tumefaciens* wurde eine 10-ml-Kultur (LB-Medium bzw. YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt) mit einer Kolonie oder von einem

Ausstrich angeimpft und über Nacht bei 37 °C bzw. 28 °C schüttelnd inkubiert. Von dieser Kultur wurde 1 ml mit 600 µl 70 % (v/v) Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2. Arbeiten mit Hefe

2.2.2.1 Herstellung und Transformation kompetenter *Saccharomyces-cerevisiae*-Zellen (modifiziert nach Gietz & Woods (2002))

Da die Kompetenz von Hefezellen bei längerer Lagerung schnell abnimmt, wurde sie unmittelbar vor jeder Transformation erzeugt. Dafür wurde eine 10-ml-Flüssigkultur (YPD-Medium, Tab. 6) von einem frischen Ausstrich des L40ccua-Stammes (Tab. 10) angeimpft und über Nacht bei 160 rpm und 30 °C inkubiert. In einem 500-ml-Schikanekolben wurden dann 50 ml vorgewärmtes YPD-Medium (Tab. 6) mit der Vorkultur auf $OD_{600} = 0,3$ eingestellt und so lange schüttelnd bei 30 °C inkubiert, bis die OD_{600} 0,6-0,9 betrug. Die Kultur wurde in ein konisches 50-ml-Röhrchen überführt und die Zellen abzentrifugiert (5 min, 2000 g, RT). Das Zellpellet wurde dann durch leichtes Aufschütteln in 10-15 ml Mix 1 (100 mM Lithiumacetat; 1 M Sorbitol; 0,5x TE [5 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; pH 7,5]; in ddH₂O) resuspendiert und anschließend 5 min bei 2000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 1 ml Mix 1 aufgenommen und die Zellen vor der Transformation zehn Minuten bei RT inkubiert.

Für die Transformation wurde Heringssperma-DNA (10 µg/µl) 5 min bei 95 °C aufgeköcht und bis zum Einsatz auf Eis gelagert. Nach der zehnmütigen Inkubation der Zellen wurden 1 µg Plasmid-DNA, 15 µl Heringssperma-DNA und 600 µl Mix 2 (100 mM Lithiumacetat; 40 % [v/v] PEG 3350; 1x TE [10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5]; in ddH₂O) gemischt und dann 100 µl der aufbereiteten Zellen hinzupipettiert. Der Transformationsansatz wurde gemischt, 20-30 min bei 30 °C inkubiert und dann nach Zugabe von 30 µl DMSO einem Hitzeschock (20-30 min, 42 °C) im Wasserbad unterzogen. Schließlich wurden die Zellen für 1-3 min bei 4000 g und RT sedimentiert, in 200 µl SD-Medium (Tab. 6) aufgenommen und auf selektivem SD-Festmedium (Tab. 6) ausplattiert.

2.2.2.2. *Yeast one hybrid*

Um die Bindung von Typ-B-ARRs an die proximalen Promotorbereiche von *MIR172*-Genen zu testen, wurde ein *Yeast-one-hybrid*-Matrixansatz durchgeführt. Dafür mussten die regulatorischen DNA-Sequenzen zunächst ins Hefegenom integriert werden. Hierfür wurden die zu untersuchenden DNA-Sequenzen in den Vektor pHISi-1-GW (Tab. 11) kloniert (s. Abschnitt 2.2.4.9) und dabei ein Reporter-konstrukt bestehend aus *MIR172*-Promotor, *HIS3*-Minimalpromotor und *HIS3*-Gen erzeugt. Das Plasmid wurde dann in den für die Aminosäuren Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil auxotrophen Hefe-

stamm L40ccua (Tab. 10) transformiert (s. Abschnitt 2.2.2.1). Die Integration des Reporterkonstrukts ins Hefegenom wurde dabei über homologe Rekombination mit dem z. T. deletierten und damit nicht-funktionalen *HIS3*-Lokus des Hefechromosoms ermöglicht. Da dieser Prozess mit sehr geringer Effizienz geschieht, wurden die pHISi-Plasmide vor der Transformation innerhalb der *HIS3*-Terminatorsequenz mit dem Restriktionsenzym *XhoI* geschnitten (s. Abschnitt 2.2.4.5). Das integrierte *HIS3*-Gen ist aufgrund des vorgeschalteten Minimalpromotors Selektionsmarker und Interaktionsreporter zugleich. Der Vektor besitzt kein separates Auxotrophiemarkergen, sodass die Hefen mit den verschiedenen Reporterkonstrukten auf SD-Medium (Tab. 6) ohne Histidin (SD/-His) unterschiedlich schnell wuchsen und Kolonien nach 3-6 Tagen sichtbar wurden. Die Kolonien der auf diese Weise hergestellten und selektierten Reporterstämme wurden dann auf neue Platten umgestrichen und mittels Hefe-Kolonie-PCR (s. Abschnitt 2.2.4.4) auf die erfolgreiche Integration überprüft.

In einer zweiten Transformationsrunde wurden die Hefe-Reporterstämme mit pACT2-Plasmiden transformiert (s. Abschnitt 2.2.2.1), welche Fusionen der Typ-B-ARRs ARR1, ARR2, ARR10, ARR11, ARR12, ARR14 und ARR18 mit der GAL4-Aktivierungsdomäne unter der Kontrolle des konstitutiven *ADH1*-Promotors exprimieren (Tab. 11). Der pACT2-Vektor enthält ein *LEU2*-Gen, das den auxotrophen Hefestamm befähigt auf SD-Medium ohne Zugabe der Aminosäure Leucin (Leu) zu wachsen. Die transformierten Hefen wurden dementsprechend auf SD/-His/-Leu ausplattiert und nach 3-6 Tagen auf frische Platten umgestrichen.

Um die *HIS3*-Hintergrundexpression, die durch den vorgeschalteten *HIS3*-Minimalpromotor bewirkt wird, im Interaktionstest zu unterdrücken, wurde 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT), ein Kompetitor der Histidinbiosynthese, ins Medium gegeben. Um die geeignete 3-AT-Konzentration für den Interaktionstest zu bestimmen, wurden gleiche Mengen der Hefe-Reporterstämme mit dem pACT2-Leervektor in SD-Medium (Tab. 6) resuspendiert und in drei Verdünnungsstufen (1, 1:10, 1:100) auf SD/-His/-Leu und mit verschiedenen 3-AT-Konzentrationen (0 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM) getropft und sechs Tage bei 30 °C inkubiert.

Für den eigentlichen Interaktionstest der Typ-B-ARRs mit den Promotorfragmenten der *MIR172*-Gene wurden die Hefetransformanten wie zuvor beschrieben auf SD/-His/-Leu/+3-AT getropft. Nach sechs Tagen wurden die Hefekontrollen, die auf SD/-His/-Leu ohne 3-AT gewachsen waren, fotografiert, die 3-AT-haltigen Platten wurden erst zehn Tage später fotografiert, da vorher kein Wachstum zu erkennen war.

2.2.2.3. Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Zur Herstellung einer Glycerin-Dauerkultur von *S. cerevisiae* wurde eine 10-ml-Kultur (SD-Medium mit entsprechenden Aminosäuren versetzt) mit einer Kolonie oder von einem Ausstrich angeimpft und für

24-48 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Von dieser Kultur wurde 1 ml mit 600 µl 70 % (v/v) Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3. Arbeiten mit Pflanzen

2.2.3.1. Transiente Proteinexpression in Blättern von *Nicotiana benthamiana* mittels *Agrobacterium tumefaciens* (modifiziert nach Sparkes *et al.* (2006))

Für die transiente Expression von *p35S:CKX1* und *p35S:CKX1-4xMyc* in Blättern von *Nicotiana benthamiana* mittels *Agrobacterium tumefaciens* wurden 10-ml-YEB-Kulturen inklusive entsprechender Antibiotika (Tab. 11 und Tab. 12) aus Glycerin-Dauerkulturen (s. Abschnitt 2.2.1.7) angeimpft. Außerdem wurde eine weitere YEB-Kultur mit dem *A.-tumefaciens*-Stamm C58C1(pCH32) (Tab. 10) beimpft, der den *Silencing Inhibitor* p19 exprimiert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 28 °C und 180 rpm inkubiert und 2 ml der Bakteriensuspension in einem Reaktionsgefäß für 5 min bei 4000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Infiltrationsmedium (50 mM MES [pH 5,7]; 10 mM MgCl₂; 0,1 mM Acetosyringon (in DMSO); 0,5 % [w/v] Glucose; in ddH₂O) resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und anschließend die OD₆₀₀ bestimmt. Die Bakteriensuspensionen wurden mit Infiltrationsmedium auf OD₆₀₀ = 0,1 verdünnt, wobei die Agrobakterienstämme mit den *p35S:CKX1*-Konstrukten jeweils in gleichem Verhältnis mit dem p19-Stamm gemischt wurden. Für die Infiltration wurden zwei bis drei große Blätter fünf bis sechs Wochen alter *Nicotiana-benthamiana*-Pflanzen ausgewählt, die Unterseite mit einer Rasierklinge angeritzt und die Bakteriensuspension mit einer 2,5-ml-Spritze eingespritzt. Als Kontrolle wurden Blätter nur mit dem p19-Stamm infiltriert. Die Pflanzen wurden dann für drei Tage zurück ins Gewächshaus gestellt. Aus den infiltrierten Blättern wurden Blattscheiben ausgestanzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2. Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach einem Protokoll von Davis *et al.* (2009), das auf der *Flower-Dip*-Methode von Clough & Bent (1998) basiert. Dafür wurden vier bis fünf Wochen alte, unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogene *A.-thaliana*-Pflanzen benutzt. Nach Verifizierung der generierten Konstrukte mittels Restriktionsanalyse (s. Abschnitt 2.2.4.5) und Sequenzierung (s. Abschnitt 2.1.7) wurden sie in den *A.-tumefaciens*-Stamm GV3101::pMP90 (Tab. 10) transformiert (s. Abschnitt 2.2.1.6). Einige wenige Kolonien wurden auf eine neue selektive LB-Platte umgestrichen und der Erfolg der Transformation mittels Kolonie-PCR (s. Abschnitt 2.2.4.4) überprüft.

Von dem Ausstrich wurde morgens eine Vorkultur (10 ml YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika) angeimpft und etwa 24 h bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 500 ml YEB-Flüssigmedium ohne Antibiotika mit 5 ml Vorkultur inokuliert und diese Hauptkultur bis zum Abend des nächsten Tages bei 28 °C geschüttelt. Dann wurden 200 µl Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX) hinzugefügt, durch Schwenken des Kolbens mit der Bakteriensuspension gemischt und die Kultur in ein Weckglas umgefüllt. Die zu transformierenden *A.-thaliana*-Pflanzen wurden zweimal für etwa zehn Sekunden mit den Blüten voran in die Bakteriensuspension getaucht und dabei leicht geschüttelt. Ein Autoklavierbeutel wurde an einer langen und einer kurzen Seite aufgeschnitten und eine Pflanzenschale mit einer Hälfte des Beutels ausgelegt. Die gedippten Pflanzen wurden darauf gelegt und mit der anderen Beutelhälfte, einer durchsichtigen Plastikhaube sowie einem Küchenhandtuch bedeckt und über Nacht bei RT inkubiert. Am Folgemorgen wurden die Pflanzen wieder ausgepackt und aufrecht in der Pflanzenschale ins Gewächshaus gestellt.

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden schließlich geerntet und zur Selektion der Transformanten entweder auf Erde angezogen (s. Abschnitt 2.1.8.1) und die Keimlinge zweimal im Abstand von einer Woche mit 0,1 % (v/v) Basta (Bayer, Leverkusen, D) besprüht oder die Samen wurden auf Antibiotika-haltigem Festmedium (Tab. 8 und Tab. 9) ausgelegt. Die Segregationsanalysen in den Folgegenerationen zur Identifizierung von homozygoten Linien mit Einzelinsertion wurden nur noch *in vitro* unter Verwendung eines entsprechenden Antibiotikums bzw. des Herbizids Phosphinothricin (Tab. 9) durchgeführt.

2.2.3.3. Genetische Kreuzungen von *Arabidopsis thaliana*

Für Kreuzungen zweier *Arabidopsis*-Linien wurden an Haupt- oder Seitentrieben des weiblichen Kreuzungspartners Blütenknospen ausgewählt, deren Petalen (Kronblätter) kaum sichtbar waren und deren Antheren (Staubbeutel) noch keinen Pollen auf die Narbe des Gynoeceums abgesondert hatten. Die übrigen Knospen und Blüten in der Nähe wurden abgeschnitten. Die Sepalen (Kelchblätter) und Stamina (Staubblätter) wurden mit einer Pinzette entfernt. Als männliche Kreuzungspartner wurden frisch geöffnete Blüten verwendet, deren reife Staubbeutel auf die freigelegte Narbe getupft wurden, bis diese mit ausreichend Pollen bedeckt war.

2.2.3.4. Oberflächensterilisation von *Arabidopsis-thaliana*-Samen

Für die Sterilkultur von *Arabidopsis thaliana* erfolgte zunächst eine Oberflächensterilisation der Samen. Für Segregationsanalysen, den Cafenstrol-Versuch (s. Abschnitt 2.2.3.5) und die Anzucht für Transkriptanalysen (s. Abschnitt 2.2.4.11) und den Nachweis der β -Glukuronidase-Aktivität in pflanz-

lichem Gewebe (s. Abschnitt 2.2.3.7) wurde zunächst 1 ml 70 % (v/v) Ethanol auf die Samen pipettiert, das Reaktionsgefäß ein paar Male invertiert und der Alkohol wieder abgenommen. Dann wurden die Samen für 15 min in 1 ml Sterilisationslösung (1,2 % [v/v] Natriumhypochlorit; 0,01 % [v/v] Triton X-100; in ddH₂O) bei RT geschüttelt und anschließend viermal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Schließlich wurden die Samen in 0,1 % (w/v) Agarose aufgenommen, um ein Absinken der Samen zu verhindern. Auf diese Weise konnten die Samen mit Hilfe einer 1-ml-Pipette und durch Drehen des Volumenrädchens auf Ats- oder ½-MS-Festmedium (Tab. 8) ausgelegt werden.

Für die Untersuchung des Wurzelwachstums (s. Abschnitt 2.2.3.6) wurden die Samen für zehn Minuten in 70 % (v/v) Ethanol mit 0,01 % (v/v) Triton X-100 bei RT geschüttelt, dreimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und zum Trocknen auf steriles Filterpapier transferiert. Die Samen wurden mit Hilfe eines Zahnstochers auf ½ MS-Medium mit 1 % (w/v) Saccharose (Tab. 8) ausgelegt.

2.2.3.5. Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit dem VLCFA-Inhibitor Cafenstrol

In der Epidermis produzierte sehr langkettige Fettsäuren (*Very-long-chain fatty acids*, VLCFAs) sind an der Bildung von kutikulärem Wachs beteiligt (Nobusawa *et al.*, 2013). Zur Hemmung der VLCFA-Produktion wurde der Synthese-Inhibitor Cafenstrol benutzt.

A.-thaliana-Samen wurden sterilisiert (s. Abschnitt 2.2.3.4) und in einem Raster von sechs mal sechs Samen mit ausreichend Abstand auf Ats-Medium (Tab. 8) mit 30 nM bzw. 3 µM Cafenstrol (Fluka, Buchs, CH; gelöst in DMSO) oder mit DMSO als Kontrolle ausgelegt (zwei Platten pro Genotyp). Die Platten wurden zur Stratifikation der Samen für zwei Tage im Dunkeln und bei 4 °C inkubiert und anschließend ins Licht gestellt. Nach 13 TNK wurden die Platten fotografiert und mit Hilfe der Software ImageJ (Tab. 1) wurde der maximale Keimlingsdurchmesser bestimmt.

2.2.3.6. Untersuchung des Wurzelwachstums

Für die Analyse verschiedener Wurzelparameter wurden *A.-thaliana*-Samen sterilisiert (s. Abschnitt 2.2.3.4) und auf ½-MS-Medium mit 1 % (w/v) Saccharose in quadratischen, 12 x 12 cm großen Kulturplatten ausgelegt. Zur Untersuchung der Cytokinin-Sensitivität wurde Benzyladenin (BA; gelöst in DMSO) in verschiedenen Konzentrationen (20 nM, 60 nM, 100 nM) bzw. DMSO als Kontrolle zugesetzt. Die Platten wurden zur Stratifikation der Samen für zwei Tage im Dunkeln und bei 4 °C inkubiert und anschließend in vertikaler Orientierung ins Licht gestellt. Nach zehn TNK wurde die Anzahl auswachsender Seitenwurzeln unter Zuhilfenahme eines Binokulars bestimmt. Die Platten wurden fotografiert und die Wurzeln mit Hilfe der Software ImageJ (Tab. 1) ausgemessen. Es wurden nur Pflanzen in die Auswertung einbezogen, deren Wurzeln auf der Oberfläche des Mediums gewachsen waren.

2.2.3.7. Nachweis der β -Glukuronidase-Aktivität in Geweben von *Arabidopsis thaliana* (nach Hemerly *et al.* (1993), basierend auf Jefferson *et al.* (1987))

Für den Nachweis der β -Glukuronidase-Aktivität in Geweben transgener GUS-Reporterlinien wurden *A. thaliana*-Samen entweder für die *in-vitro*-Kultur sterilisiert (s. Abschnitt 2.2.3.4) oder auf Erde ausgelegt (s. Abschnitt 2.1.8.1) und für zwei Tage im Dunkeln und bei 4 °C stratifiziert. Die zu untersuchenden Pflanzen wurden für 30-60 min in 90 % (v/v) Aceton bei -20 °C fixiert und anschließend zweimal kurz mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) gewaschen. GUS-Lösung I (20 mM Kaliumferricyanid; 50 mM Natriumphosphat-Puffer [pH 7,0]; 0,2 % [v/v] Triton X-100; in ddH₂O) und GUS-Lösung II (20 mM Kaliumferrocyanid; 50 mM Natriumphosphat-Puffer [pH 7,0]; 0,2 % [v/v] Triton X-100; in ddH₂O) wurden zu gleichen Teilen gemischt und 0,5 mg/ml (= 1 mM) 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukoronid (X-Gluc; zuvor gelöst in DMSO) dazugegeben. Der Natriumphosphat-Puffer wurde gegen die Färbelösung ausgetauscht und dreimal für 5 min wurde ein Vakuum angelegt, um das Eindringen ins Gewebe zu erleichtern. Dann wurde das Gewebe für 1-24 h bei 37 °C inkubiert, bis die gewünschte Intensität der Färbung erreicht war. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol abgestoppt.

Für die mikroskopische Untersuchung wurde das Gewebe geklärt (modifiziert nach Malamy & Benfey (1997)). Dafür wurden die Proben zunächst für 15 min bei 57 °C in Lösung I (20 % [v/v] Methanol; 0,24 N HCl; in ddH₂O) und danach für 15 min bei RT in Lösung II (60 % [v/v] Ethanol; 7 % [w/v] NaOH; in ddH₂O) inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mittels einer Ethanolreihe rehydriert (40 %, 20 % und 10 %, jeweils 5 min). Dann wurden die Proben in Lösung III (5 % [v/v] Ethanol; 25 % [v/v] Glycerin; in ddH₂O) überführt und für 15 min bei RT inkubiert. Die lichtmikroskopische Analyse erfolgte in 50 % (v/v) Glycerin mit dem Stereomikroskop SZX12 (Olympus, Tokio, JP) oder mit dem Mikroskop Axioskop 2 Plus (Zeiss, Jena, D).

Um Gewebeschnitte zu erstellen, wurden die GUS-gefärbten Pflanzen zunächst durch eine Ethanolserie (20 %, 30 %, 50 %) dehydriert. Anschließend wurde das Gewebe wie in Abschnitt 2.2.3.8 beschrieben in Paraffin eingebettet und 8- μ m-Schnitte erstellt.

2.2.3.8. Einbettung und Schneiden von Pflanzengewebe

Für die Anfertigung von Gewebeschnitten wurde das Pflanzenmaterial in ein Fixativ (10 % [v/v] Formaldehyd; 5 % [v/v] Eisessig; 50 % [v/v] Ethanol; in ddH₂O) überführt und das Eindringen ins Gewebe durch Anlegen eines Vakuums (dreimal 10 min) begünstigt. Das Fixativ wurde gegen frisches ausgetauscht und das Gewebe leicht schüttelnd über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde das Gewebe durch eine Ethanolserie (50 %, 60 %, 70 %, 85 %, 95 %, jeweils 45 min) bei 4 °C dehydriert. Der 95-prozentigen Ethanollösung wurde Eosin Y zugesetzt, welches die basischen Zellbestandteile anfärbt und damit das entfärbte Gewebe vom weißen Paraffin optisch abgrenzt. Die folgenden Schritte erfolgten bei RT:

2 x 30 min 100 % (v/v) Ethanol + Eosin Y; 2 x 45 min 100 % (v/v) Ethanol; 30 min 75 % (v/v) Ethanol + 25 % (v/v) Roti[®]-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, D); 30 min 50 % (v/v) Ethanol + 50 % (v/v) Roti[®]-Histol; 30 min 25 % (v/v) Ethanol + 75 % (v/v) Roti[®]-Histol, 2 x 45 min 100 % (v/v) Roti[®]-Histol. Das Roti[®]-Histol wurde zur Hälfte entfernt, die Probengläschen mit Paraplast X-TRA[®] (Sigma-Aldrich, München, D) aufgefüllt und über Nacht bei 58 °C inkubiert. An den drei folgenden Tagen wurde der Wachs zwei- bis dreimal täglich abgegossen und durch frischen, flüssigen Wachs aus dem Paraffinspender EG1120 (Leica, Wetzlar, D) ersetzt. Am Ende des dritten Tages wurde das Gewebe zusammen mit dem Wachs in Petrischalen gefüllt und bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlschrank gelagert.

Die Gewebeschnitte wurden an dem Rotationsmikrotom RM2255 (Leica, Wetzlar, D) durchgeführt. Für Schnitte des Infloreszenzstengels wurde eine Schnittdicke von 14 µm gewählt, für alle anderen Gewebetypen wurden 8-µm-Schnitte angefertigt. Die geschnittenen Wachsbänder wurden auf die Oberfläche eines etwa 35 °C warmen Wasserbades transferiert und von dort auf positiv geladene Objektträger übertragen. Die Objekte wurden dann für 24-48 h auf einer Heizplatte bei 42 °C getrocknet. Das Wachs wurde durch Behandlung mit Roti[®]-Histol (2 x 10 min) entfernt. Die Schnitte wurden durch eine Ethanolreihe rehydriert (2 x 100 %, je 1 x 95 %, 85 %, 70 %, 50 %, 30 %, jeweils 2 min), kurz in Wasser gewaschen und dann in 50 % (v/v) Glycerin untersucht. Meristemschnitte wurden am Mikroskop Axioskop 2 Plus (Zeiss, Jena, D) betrachtet, die Stengelquerschnitte am Stereomikroskop SZX12 (Olympus, Tokio, JP).

2.2.3.9. Untersuchung pflanzlicher Parameter

Rosettendurchmesser und Pflanzenhöhe wurden mit einem Lineal ausgemessen. Der Rosettendurchmesser wurde ermittelt, nachdem alle Pflanzen des Experiments die reproduktive Phase erreicht hatten. Die Pflanzenhöhe und die Anzahl der Schoten wurden nach Beendigung der Blühphase bestimmt.

Für die Bestimmung des Samenertrags wurden die Pflanzen in sog. Aracons angezogen, durchsichtige Plastikröhren, in denen die fallenden Samen aufgefangen werden. Erst nachdem die Pflanzen ihr Wachstum beendet und getrocknet waren, wurden die Aracons entfernt, die Gesamtheit der Samen geerntet und mit Hilfe einer Waage das Gewicht des Ertrags ermittelt.

Um die Schotenlänge, die Samenanzahl pro Schote sowie die Samendichte zu ermitteln, wurden ausgewachsene, noch grüne Schoten geerntet und das Chlorophyll durch mehrmaliges Inkubieren in 70 % (v/v) Ethanol ausgewaschen. Die Schoten wurden dann am Stereomikroskop SZX12 (Olympus, Tokio, JP) fotografiert und anhand der Bilder die Anzahl der Samen pro Schote bestimmt. Die Schotenlänge wurde mit Hilfe der Software ImageJ (Tab. 1) ermittelt. Für die Analyse der Samengröße wurden die Samen ebenfalls am Stereomikroskop fotografiert.

Als Blühbeginn wurde der Zeitpunkt festgelegt, an dem der Infloreszenzstengel eine Länge von 5 mm erreicht hatte. Der Blühzeitpunkt ist in Tagen nach Keimung (TNK) angegeben. Der Tag, an dem die Aussaaten ins Licht gestellt wurden sowie der darauffolgende Tag wurden nicht gezählt, sondern es wurde stets am dritten Tag mit dem Zählen begonnen. Für die Pflanzen eines Experiments wurde der Blühzeitpunkt stets zur gleichen Tageszeit dokumentiert. Um die Anzahl an juvenilen und adulten Rosettenblättern zu bestimmen, wurden die Blätter mit Hilfe eines Binokulars auf das Vorhandensein abaxialer Trichome untersucht.

Zellgröße, Zellzahl und Stomataindex wurden anhand des siebten Rosettenblattes analysiert, wobei vorher sichergestellt wurde nur solche mit adulter Blattidentität zu verwenden. Adulte Blätter weisen eine höhere Zellzahl und eine geringere Zellgröße im Vergleich zu juvenilen Blättern auf (Usami *et al.*, 2009). Die Blätter wurden wie in Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben fixiert und anschließend unter dem Stereomikroskop SZX12 fotografiert, um mit Hilfe des ImageJ-Programms die Größe der Blattspreite bestimmen zu können. Außerdem wurden am Mikroskop Axioskop 2 Plus Ausschnitte der abaxialen Epidermis fotografiert und zwar nach einem Viertel, der Hälfte und einem Dreiviertel der Blattspreite, jeweils auf beiden Seiten der Mittelrippe, mittig zwischen Mittelrippe und Blattrand. Daraus ergaben sich sechs Epidermisausschnitte pro Blatt, deren Zellen und Stomata gezählt wurden. Für jedes analysierte Blatt wurde ein Mittelwert gebildet. Der Stomataindex ergab sich aus dem Anteil der Stomata an der Gesamtpopulation der epidermalen Zellen.

Für die Analyse des Stengeldurchmessers wurden Stengelabschnitte 2-3 cm oberhalb der Rosette entnommen, wenn die Infloreszenzstengel 12-15 cm hoch waren. Die Stengelstücke wurden unter dem Stereomikroskop SZX12 fotografiert und anschließend wie in Abschnitt 2.2.3.8 beschrieben fixiert und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe des Rotationsmikrotoms RM2255 (Leica, Wetzlar, D) wurden 14 µm dicke Schnitte angefertigt, mit denen zunächst wie in Abschnitt 2.2.3.8 beschrieben weiterverfahren wurde. Nachdem die Stengelquerschnitte nach der Ethanolserie kurz in Wasser gewaschen worden waren, wurden sie in 0,1 % (w/v) Toluidinblau gefärbt und der überschüssige Farbstoff mit ddH₂O gewegewaschen. Dann wurden die Schnitte in 50 % (v/v) Glycerin am Stereomikroskop SZX12 fotografiert. Für die Quantifizierung des Stengeldurchmessers, die mit Hilfe der ImageJ-Software (Tab. 1) durchgeführt wurde, wurde aufgrund der nicht immer kreisrunden Form pro Querschnitt der Mittelwert zweier Messungen berechnet.

2.2.3.10. Induktion von *A.-thaliana*-Keimlingen mit Cytokinin

Um den Einfluss von Cytokinin auf die Expression der *MIR156*- und *MIR172*- sowie von deren Zielgenen zu messen, wurden Samen des *A.-thaliana*-Ökotyps Col-0 mit Natriumhypochlorit-Lösung wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben sterilisiert und anschließend auf die *wells* von 12-*well*-Kulturplatten mit je

2,5 ml ½-MS-Medium mit 0,1 % (w/v) Saccharose (Tab. 8) verteilt (etwa zehn Samen pro *well*). Die Samen wurden zwei Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend ins Licht gestellt (Langtagbedingungen). Zehn TNK wurde zum Beginn der Lichtphase Benzyladenin (BA) mit einer Endkonzentration von 1 µM ins Medium gegeben. Dazu wurde eine 100 mM BA-Stammösung (in 1 M KOH) in 0,05 % (w/v) MES (pH nicht eingestellt) auf 100 µM verdünnt. Für die Mockbehandlung wurde das gleiche Volumen 1 M KOH mit der MES-Lösung verdünnt. Beide Induktionslösungen wurden auf den pH-Wert 6,0 eingestellt. Jeweils 25 µl wurden in die *wells* pipettiert und die Platten kurz geschwenkt, um die Induktionslösungen gleichmäßig zu verteilen. In einem Zeitraum von 24 Stunden wurden dann zu definierten Zeitpunkten Keimlinge geerntet, um anschließend mit Hilfe von qRT-PCR-Analysen (s. Abschnitt 2.2.4.11) die Kinetik der Genexpression in Reaktion auf die Cytokininbehandlung zu analysieren.

2.2.4. Molekularbiologische Arbeiten

2.2.4.1. Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial (modifiziert nach Edwards *et al.* (1991))

Für die Extraktion pflanzlicher genomischer DNA wurden 100-200 mg Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* mit 300 µl DNA-Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA [pH 8,0]; 0,5 % [w/v] SDS; in ddH₂O) versetzt und mit Hilfe der Schwingmühle MM 300 von Retsch (Haan, D) zerkleinert. Das unlösliche Material wurde mittels Zentrifugation (5-10 min, 16000 g, RT bzw. 10 min, 2800 g, RT) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit 300 µl Isopropanol versetzt und durch Invertieren gemischt und die DNA anschließend durch Zentrifugation (10 min, 16000 g, RT bzw. 60 min, 2800 g, RT) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (5 min, 16000 g, RT bzw. 10 min, 2800 g, RT). Das Pellet wurde dann bei RT getrocknet, in 80-100 µl 1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]; in ddH₂O) aufgenommen und zum Lösen über Nacht bei 8 °C inkubiert.

2.2.4.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Die RNA-Isolierung erfolgte unter Zuhilfenahme RNase-freier Materialien und Lösungen. Etwa 100-200 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit der Schwingmühle MM 300 von Retsch (Haan, D) zerkleinert. Die Extraktion der Gesamt-RNA wurde entweder gemäß Herstellerangaben mit dem NucleoSpin RNA Plant Kit bzw. dem RNeasy Plant Mini Kit (Tab. 2) oder nach der Trizol-Methode durchgeführt. Für letztere wurde das tiefgefrorenen Pflanzenpulver in 1 ml TRIsure (Bioline, Luckenwalde, D; Kat.-Nr. BIO-38033) durch kräftiges Mischen homogenisiert. Um das unlösliche Material abzutrennen, wurde das Homogenat für 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Über-

stand wurde anschließend in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit je 200 µl Chloroform 15 sec lang gründlich durchmischt und weitere 3 min bei RT inkubiert, bis eine Phasentrennung sichtbar wurde. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert, 500 µl kaltes Isopropanol zugefügt und einige Male invertiert. Die Ansätze wurden für 10 min bei RT stehen gelassen und die RNA anschließend durch Zentrifugation (15 min, 12000 g, 4 °C) gefällt. Der Überstand wurde entfernt und das RNA-Pellet in 1 ml 80 % (v/v) Ethanol gewaschen (10 min, 12000 g, 4 °C). Nachdem das RNA-Pellet bei RT getrocknet worden war, wurde es durch Inkubation für 5 min bei 60 °C in 25-40 µl ddH₂O gelöst. Die extrahierte RNA wurde anschließend mit DNase I (Tab. 3) nach Angaben des Herstellers behandelt, um DNA-Rückstände in der RNA-Lösung zu beseitigen.

Die RNA-Konzentration wurde mittels eines Spektrophotometers (NanoDrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen, D) bei 260 nm ermittelt, wobei $E_{260} = 1$ einer Menge von 40 ng RNA pro µl entspricht. Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde 1 µg jeder Probe auf ein zwei Prozentiges Agarosegel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abschnitt 2.2.4.7).

2.2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.-coli*-Zellen wurden 4 ml LB-Flüssigmedium (Tab. 4) inklusive entsprechender Antibiotika (Tab. 5) mit einer Kolonie oder von einem Ausstrich angeimpft und über Nacht unter Schütteln (180 rpm) bei 37 °C inkubiert. Von der Kultur wurden 2 ml in ein Reaktionsgefäß überführt, die Zellen durch Zentrifugation (2 min, 8000 g, RT) geerntet und der Überstand vollständig abgenommen. Die Plasmid-Minipräparation erfolgte entweder mit Hilfe des Kits Invisorb Spin Plasmid Mini Two (Tab. 2) nach Angaben des Herstellers oder nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Qiagen *Plasmid Purification Handbook*, modifiziert nach Birnboim & Doly (1979)). Für letztere Methode wurde das Zellsediment in 150 µl P1-Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 10 mM EDTA [pH 8,0]; 100 µg/ml RNase A; in ddH₂O) resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 500 µl P2-Puffer (0,2 M NaOH; 1 % [w/v] SDS; in ddH₂O) für 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurde die Suspension durch Zugabe von 350 µl P3-Puffer (3 M Kaliumacetat [pH 5,0]; in ddH₂O) neutralisiert, um Proteine und genomische DNA auszufällen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (2x 5 min, 16000 g, 4 °C) sedimentiert und der Überstand zur Fällung der Plasmid-DNA in einem neuen 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 16000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (10 min, 16000 g, 4 °C). Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und dann in 50 µl ddH₂O gelöst.

Die DNA-Konzentration wurde anschließend mittels eines Spektrophotometers (NanoDrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen, D) bei 260 nm ermittelt, wobei $E_{260} = 1$ einer Menge von 50 ng dsDNA pro µl ent-

spricht. Gegebenenfalls wurden zusätzlich 500 ng Plasmid-DNA auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen die Bandenstärke nach elektrophoretischer Auftrennung (s. Abschnitt 2.2.4.7) mit einem quantitativen Standard verglichen.

2.2.4.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktionen (PCRs) dienen der Amplifikation von bestimmten DNA-Fragmenten und wurden in Anlehnung an die von Mullis & Faloona (1987) entwickelte Methode durchgeführt. Für Genotypisierungen und Kolonie-PCRs wurde eine selbstgereinigte *Taq*-Polymerase (Tab. 3) sowie ein selbst hergestellter 10x Reaktionspuffer (160 mM Ammoniumsulfat; 670 mM Tris-HCl [pH 8,8]; 20 mM MgCl₂; 0,1 % [v/v] Tween 20; in ddH₂O) verwendet. Für Klonierungszwecke wurde hingegen eine DNA-Polymerase mit *Proofreading*-Aktivität (3'→5'-Exonuklease-Aktivität) von Fermentas/Thermo Scientific (Tab. 3) und die mitgelieferten Komponenten eingesetzt. PCRs wurden im *Thermocycler* T-Gradient, T1, T3 oder TProfessional der Firma Biometra (Göttingen, D) durchgeführt. PCR-Programme wurden stets hinsichtlich *Annealing*-Temperatur (optimale Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA), Elongationszeit und Zyklenanzahl an die jeweilige Reaktion angepasst.

Genotypisierung

Für Genotypisierungen und sonstige PCRs wurde der in Tab. 15 aufgeführte Standard-Reaktionsansatz genutzt. In Tab. 16 ist das verwendete Standard-PCR-Programm gezeigt.

Kolonie-PCR (*E. coli*, *A. tumefaciens*)

Für Kolonie-PCRs zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* oder *A. tumefaciens* wurden die zu testenden Kolonien in jeweils 10,5 µl ddH₂O resuspendiert, die übrigen PCR-Komponenten wie in Tab. 15 angegeben (mit Ausnahme der *Template*-DNA) zugefügt und mit ddH₂O auf 20 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Das PCR-Programm wurde wie in Tab. 16 angegeben durchgeführt.

Kolonie-PCR (*S. cerevisiae*)

Zur Bestätigung der erfolgreichen Transformation von Hefezellen wurden die zu überprüfenden Kolonien in jeweils 20 µl 20 mM NaOH für 45-60 min bei 95 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 2800 g und RT zentrifugiert. Der Reaktionsansatz entsprach dem in Tab. 15 angegebenen, anstelle von

Template-DNA wurden aber 2 µl des Überstandes eingesetzt. Der verwendete Temperaturzyklus entsprach dem Standard-PCR-Programm (Tab. 16).

Tab. 15: Zusammensetzung des PCR-Standardansatzes.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
<i>Taq</i> -Reaktionspuffer (10x)	2,0 µl	1x
dNTP-Mix (20 mM)	0,8 µl	0,8 mM (je 0,2 mM)
MgCl ₂ (50 mM)	0,2 µl	0,5 mM
5'-Primer (10 µM)	0,5 µl	2,5 µM
3'-Primer (10 µM)	0,5 µl	2,5 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	
<i>Template</i> -DNA	0,5-2,0 µl	

Zur Erhöhung der Spezifität der Primerbindung an die *Template*-DNA wurde meist zu dem im *Taq*-Reaktionspuffer bereits enthaltenen MgCl₂ noch zusätzliches hinzugefügt.

Tab. 16: Standard-PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	30 sec
3. Anlagerung der Oligonukleotide (Primer)	55-58 °C	35 sec
4. Elongation	72 °C	1 kb/min
5. Finale Elongation	72 °C	5-8 min

Die Schritte 1 und 5 wurden stets nur einmalig absolviert, während die Schritte 2-4 in einer von der Reaktion abhängigen Zahl (zwischen 26- und 34-mal) zyklisch wiederholt wurden.

Amplifizierung von Promotor- und Gensequenzen für Klonierungen

Die Amplifizierung von DNA-Abschnitten für Klonierungszwecke erfolgten wie in Tab. 17 und Tab. 18 dargestellt.

Tab. 17: Zusammensetzung des Phusion-PCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Phusion HF-Puffer (5x)	4,0 µl	1x
dNTP-Mix (20 mM)	0,4 µl	0,4 mM (je 0,1 mM)
MgCl ₂ (50 mM)	0,2 µl	0,5 mM
5'-Primer (10 µM)	0,5 µl	2,5 µM
3'-Primer (10 µM)	0,5 µl	2,5 µM
Phusion DNA-Polymerase	0,2 µl	0,02 U/µl
<i>Template</i> -DNA	0,5-2,0 µl	

Zur Erhöhung der Spezifität der Primerbindung an die *Template*-DNA wurde meist zu dem im *Taq*-Reaktionspuffer bereits enthaltenen MgCl₂ noch zusätzliches hinzugefügt.

Tab. 18: Phusion-PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	98 °C	1 min
2. Denaturierung	98 °C	10 sec
3. Anlagerung der Oligonukleotide (Primer)	55-60 °C	30 sec
4. Elongation	72 °C	2 kb/min
5. Finale Elongation	72 °C	5-8 min

Die Schritte 1 und 5 wurden stets nur einmalig absolviert, während die Schritte 2-4 in einer von der Reaktion abhängigen Zahl (zwischen 30- und 34-mal) zyklisch wiederholt wurden.

2.2.4.5. Restriktionsverdau

Um geeignete Enzyme für einen Restriktionsverdau zu finden, wurde das Programm VectorNTI (Tab. 1) verwendet. Bei Restriktionsverdauen mit mehreren Enzymen wurde das Internetprogramm DoubleDigest™ (Tab. 1) konsultiert, um die ideale Puffer-Enzym-Kombination zu ermitteln. Für Restriktionsverdau wurden die Restriktionsenzyme von Fermentas/Thermo Scientific (Tab. 3) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden gemäß Herstellerangaben pipettiert und bei den angegebenen Temperaturen inkubiert und inaktiviert.

2.2.4.6. Genotypisierung mittels CAPS- und dCAPS-Markeranalyse

Die Überprüfung auf das Vorhandensein der mutanten Allele *rock2* und *rock3* erfolgte durch Nachweis der jeweiligen Punktmutation mittels CAPS- bzw. dCAPS-Markeranalyse (Neff *et al.*, 1998). Dabei wurden zunächst DNA-Abschnitte amplifiziert, die die Punktmutationen überspannen (Tab. 19 und Tab. 20).

Tab. 19: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für den Nachweis der *rock2*- und *rock3*-Punktmutationen.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Taq-Reaktionspuffer (10x)	2,0 µl	1x
dNTP-Mix (20 mM)	0,8 µl	0,8 mM (je 0,2 mM)
MgCl ₂ (50 mM)	0,2 µl	0,5 mM
5'-Primer (10 µM)	2,0 µl	10 µM
3'-Primer (10 µM)	2,0 µl	10 µM
Taq-Polymerase	0,5 µl	
Template-DNA	3,0 µl	

Zur Erhöhung der Spezifität der Primerbindung an die *Template*-DNA wurde meist zu dem im *Taq*-Reaktionspuffer bereits enthaltenen MgCl₂ noch zusätzliches hinzugefügt.

Anschließend wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit 1,2 µl 10x Tango-Puffer und 0,8 µl *Xba*I (*rock2*) bzw. *Apo*I/*Xap*I (*rock3*) gemischt. Nach Inkubation für 2 h bei 37 °C wurden die Enzyme für 20 min bei 65 °C bzw. 80 °C inaktiviert. Nach Zugabe von DNA-Ladepuffer wurden die Proben auf ein zweiprozentiges

Agarosegel aufgetragen. Die verwendeten Primer und die Größen der nach dem Verdau erhaltenen DNA-Fragmente sind im Anhang zu finden.

Tab. 20: PCR-Programm für den Nachweis der *rock2*- und *rock3*-Punktmutationen.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	30 sec
3. Anlagerung der Oligonukleotide (Primer)	55-60 °C	45 sec
4. Elongation	72 °C	1 kb/min
5. Finale Elongation	72 °C	8 min

Die Schritte 1 und 5 wurden stets nur einmalig absolviert, während die Schritte 2-4 37-mal zyklisch wiederholt wurden.

2.2.4.7. Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuremolekülen wurde Agarose in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 20 mM EDTA [pH 8,0]; in ddH₂O) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst (je nach Größe der aufzutrennenden Moleküle 1-3 %), etwas abgekühlt und nach Zugabe von 0,2 µg/ml Ethidiumbromid in eine Gelschale gegossen. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (15 % [w/v] Ficoll-400; 0,1 % [w/v] Bromphenolblau-Natriumsalz; 0,1 % [w/v] Xylencyanol FF; in ddH₂O) gemischt (Endkonzentration im Reaktionsansatz: 1x). Die Auftrennung der Nucleinsäuremoleküle erfolgte in einer mit 1x TBE gefüllten, horizontalen Elektrophoreseapparatur. Für die Größenbestimmung der aufgetrennten Nucleinsäuremoleküle wurde stets auch ein Größenstandard auf das Agarosegel aufgetragen. Die Detektion mittels UV-Licht und die Dokumentation der aufgetrennten Nucleinsäuren erfolgte mit dem GeneGenius Bio Imaging System und der Software GeneSnap (SynGene, Cambridge, UK) bzw. dem Geldokumentationssystem GenoPlex und der Software GenoCapture (VWR, Darmstadt, D).

2.2.4.8. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem GENE CLEAN II Kit oder dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Tab. 2) nach Herstellerangaben. Um die Auftrennung in Agarosegelen und die Gefahr von Mutationen durch UV-Bestrahlung der DNA-Moleküle zu umgehen, wurden PCR-Amplifikate häufig durch gröbenselektive Fällung in PEG aufgereinigt. Um DNA-Fragmente <300 bp zu entfernen wurde der PCR-Ansatz vierfach mit 1x TE verdünnt und mit einem halben Volumen PEG/MgCl₂-Lösung aus dem Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix Kit (Tab. 3) gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 16000 g und RT. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Pellet in

70 % (v/v) Ethanol gewaschen (5 min, 16000 g, RT) und in einer geeigneten Menge ddH₂O aufgenommen.

2.2.4.9. Gateway®-Klonierung

Alle Konstrukte dieser Arbeit wurden im Gateway®- oder MultiSite-Gateway®-System erstellt. Die für die Rekombination erforderlichen *attachment sites* (Tab. 21) wurden den Oligonukleotiden angehängt, mit denen die zu klonierenden DNA-Fragmente amplifiziert wurden. Eine Liste der verwendeten Klonierungsprimer ist im Anhang zu finden.

Für die Klonierung der Gensequenzen von *ARR1-SRDX*, *CKX1* und *LOG4* wurden die *attachment sites* entsprechend der Herstellerangaben verlängert (Tab. 21), um eventuelle Fusionen (z. B. mit dem 4xMyc-Tag) im Leseraster zu gewährleisten. Die Sequenz von *ARR1-SRDX* ohne Stoppcodon wurde von dem Plasmid pDONRTM201/*ARR1-SRDX* (Heyl *et al.*, 2008) amplifiziert, das die fusionierten Kodierungssequenzen von *ARR1* und *SRDX* des *Arabidopsis-thaliana*-Ökotyps C24 enthält. Für die Klonierung von *CKX1* ohne Stoppcodon wurde die genomische Sequenz des Ökotyps Col-0 verwendet. Die *LOG4*-Kodierungssequenz mit Stoppcodon wurde von cDNA des Ökotyps Col-0 amplifiziert. Die Gensequenzen wurden mit den *attachment sites* attB1 und attB2 (Tab. 21) versehen und unter der Verwendung des Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix (Tab. 3) nach Herstellerangaben in den pDONRTM221 (Tab. 11) kloniert.

Die Promotorfragmente von *ATML1* (-5488 bis -1581 bp 5'-wärts des Startcodons), *PDF1* (-380 bis -1 bp 5'-wärts des Startcodons) und *MIR165A* (-1450 bis -129 bp 5'-wärts des Startcodons) wurden in die Vektoren pDONRTMP4-P1R und pDONRTM221 rekombiniert, während *pMIR172B* (-2293 bis -1 bp 5'-wärts des Startcodons), *pMIR172D* (-2010 bis -1 bp 5'-wärts des Startcodons) und *pMIR172E* (-839 bis -1 bp 5'-wärts des Startcodons) ausschließlich in den pDONRTM221 kloniert wurden. Die Rekombinationen wurden unter Gebrauch des Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix oder Gateway® BP Clonase® Enzyme II Mix (Tab. 3) und mit den entsprechenden att-Sequenzen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Erstellung von *GFP-GUS*-Reporterkonstrukten im pKGWFS7 (Tab. 11) und Hefe-Interaktionsreportern im pHISi-1-GW (Tab. 11) wurden die Promotorsequenzen mit Hilfe des Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix (Tab. 3) nach Angaben des Herstellers aus dem jeweiligen pDONRTM221 in die Destinationsvektoren überführt. Die Kombination von Promotor, Gen und Tag im pB7m34GW (Tab. 11) erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben mit Hilfe des Gateway® LR Clonase® Enzyme II Mix (Tab. 3).

Alle generierten Plasmide (Tab. 12) wurden durch PCR (s. Abschnitt 2.2.4.4) und zwei verschiedene Restriktionsverdauere (s. Abschnitt 2.2.4.5) überprüft. Die DONRTM-Vektoren wurden zudem sequenziert (s. Abschnitt 2.1.7).

Tab. 21: Sequenzen der Gateway®-attachment-sites für die Klonierung von DNA-Fragmenten in die entsprechenden DONR™-Vektoren.

Bezeichnung	Sequenz	DONR™-Vektor
attB4	5' -GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTC-3'	pDONR™P4-P1R
attB1R	5' -GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGC-3'	
attB1	5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'	pDONR™221
attB2	5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA-3'	

Die *attachment sites* (att) wurden mit den in grün gekennzeichneten DNA-Basen entsprechend der Herstellerangaben verlängert, um eventuelle Fusionen mit *Tags* im Leseraster zu gewährleisten.

2.2.4.10. Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA wurde mit 1,5 µg DNase-behandelter Gesamt-RNA (s. Abschnitt 2.2.4.2) und unter Gebrauch der reversen Transkriptase SuperScript III (Tab. 3) durchgeführt. Mix 1 (Tab. 22) wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Mix 2 (Tab. 22) wurde hinzugefügt und der Reaktionsansatz wurde dann für 5 min bei 25 °C, für 60 min bei 50 °C und für 15 min bei 70 °C inkubiert. Die resultierende cDNA wurde als 1:10-Verdünnung in qRT-Analysen (s. Abschnitt 2.2.4.11) eingesetzt.

Tab. 22: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

Mix 1		Mix 2	
Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
Gesamt-RNA	x µl (1,5 µg)	First-Strand-Puffer (5x)	4,0 µl
dNTP-Mix (20 mM)	2,0 µl	DTT (0,1 M)	1,0 µl
N9-Random-Primer (50 µM)	1,8 µl	SuperScript III (200 U/µl)	0,8 µl
Oligo-dT ₂₅ -Primer (50 µM)	1,0 µl		
ddH ₂ O (RNase-frei)	ad 14,2 µl		

Für den Nachweis der reifen microRNAs wurde die cDNA-Synthese in abgewandelter Form (modifiziert nach Chen *et al.* (2005) und Pant *et al.* (2008); Abb. 5) durchgeführt. *Stem-loop*-Mix 1 (Tab. 23) wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dieser enthielt nicht nur einen miRNA-spezifischen *Stem-loop*-Primer; um bei der späteren qRT-Analyse eine interne Kontrolle für die Normalisierung der qRT-Ergebnisse zu besitzen, wurde auch der 3'-Primer des verwendeten Referenzgenes zugefügt (die zugehörigen Sequenzen sind im Anhang zu finden). *Stem-loop*-Mix 2 (Tab. 23) wurde mit dem *Stem-loop*-Mix 1 gemischt und der Reaktionsansatz wurde dann für 30 min bei 16 °C, für 30 min bei 50 °C und für 15 min bei 70 °C inkubiert. Die resultierende cDNA wurde unverdünnt in qRT-Analysen (s. Abschnitt 2.2.4.11) eingesetzt.

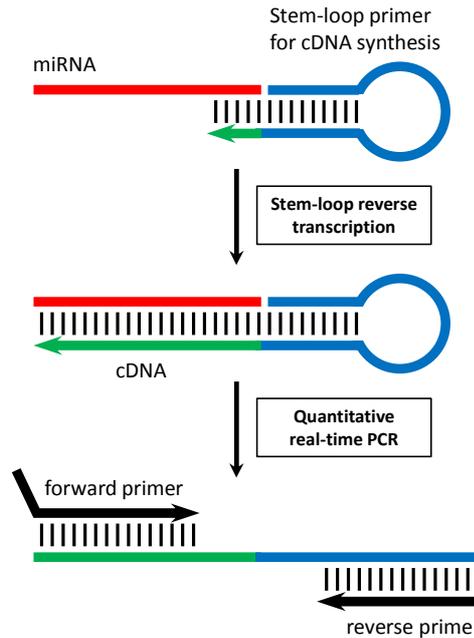


Abb. 5: Schematische Darstellung der qRT-basierten Quantifizierungsmethode für reife microRNAs. Die cDNA-Synthese wird mit einem *Stem-loop*-Primer durchgeführt, der an das 3'-Ende des miRNA-Moleküls bindet; die Quantifizierung erfolgt im Rahmen einer qRT-PCR mit einem miRNA-spezifischen 5'-Primer und einem *Stem-loop*-spezifischen 3'-Primer. Verändert nach Chen *et al.* (2005).

Tab. 23: Reaktionsansatz für die *Stem-loop*-cDNA-Synthese.

<i>Stem-loop</i> -Mix 1		<i>Stem-loop</i> -Mix 2	
Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
Gesamt-RNA	x µl (500 ng)	<i>First-Strand</i> -Puffer (5x)	2,5 µl
dNTP-Mix (20 mM)	1,0 µl	DTT (0,1 M)	0,5 µl
miRNA-spezifischer <i>Stem-Loop</i> -Primer (2,5 µM)	0,125 µl	RNaseOUT (40 U/µl)	0,3 µl
P340 (TAFII15-qRT_rev) (2,5 µM)	0,125 µl	SuperScript III (200 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O (RNase-frei)	ad 8,7 µl		

2.2.4.11. Quantitative *Real-time*-PCR (qRT-PCR)

Alle verwendeten Primerpaare wurden mit Hilfe des Primer-Blast-Programms von NCBI (Tab. 1) designt und anschließend mittels BLASTN (TAIR) und NetPrimer (Tab. 1) auf ihre Spezifität und Qualität überprüft. Alle qRT-Analysen wurden mit dem 7500 *Real-time*-PCR-System (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tab. 24 dargestellt. Das verwendete qRT-PCR-Programm ist in Tab. 25 gezeigt.

Vor ihrem Einsatz in qRT-Analysen wurden die Primereffizienzen aller verwendeten Primerpaare getestet. Dafür wurde die cDNA der Wildtyp-Kontrolle in verschiedenen Verdünnungsstufen verwendet. Primerpaare für normale qRT-Analysen wurden mit den cDNA-Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 und 1:640 getestet, für *Stem-loop*-qRT-Analysen bestand die Verdünnungsreihe aus 1, 1:10,

1:20, 1:40, 1:80, 1:160 und 1:320. Diese verdünnten cDNA-Proben wurden in drei technischen Replikaten gemessen und die resultierenden Ct-Werte über dem Logarithmus der cDNA-Menge dargestellt. Die Primereffizienz E (in %) wurde nach $E = 10^{-1/\text{Steigung der Regressionsgeraden}} \cdot 100$ berechnet. Primerpaare wurden als geeignet angesehen, wenn der Regressionskoeffizient R^2 (Angabe der Nähe der ermittelten Werte zur Regressionsgeraden) $> 0,98$ war und die Effizienz E zwischen 85 % und 115 % lag.

Tab. 24: Reaktionsansatz für qRT-Analysen.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Immolase-Puffer (10x)	2,0 µl	1x
MgCl ₂ (50 mM)	0,8 µl	2 mM
dNTP-Mix (20 mM)	0,4 µl	100 µM
SYBR Green I (10x)	0,2 µl	0,1x
ROX (25 µM)	0,04 µl	50 nM
5'-Primer (50 µM)	0,12 µl bzw. 0,2 µl	300 nM bzw. 500 nM
3'-Primer (50 µM)	0,12 µl bzw. 0,2 µl	300 nM bzw. 500 nM
Immolase (5 U/µl)	0,04 µl	0,01 U
cDNA	2,0 µl bzw. 6,0 µl	

Die Expressionsanalysen der miRNA-Primärtranskripte und der reifen miRNAs wurden stets mit 6 µl cDNA durchgeführt, in allen anderen qRT-Analysen wurden 2 µl cDNA eingesetzt. Bei gewöhnlichen Transkriptanalysen wurde 1:10-verdünnte cDNA verwendet, die Detektion der reifen miRNAs und des zugehörigen Referenzgens erfolgte mit unverdünnter cDNA.

Tab. 25: qRT-PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung/Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	15 min
2. Denaturierung	95 °C	5 sec
3. Anlagerung der Oligonukleotide (Primer)	55 °C	15 sec
4. Elongation	72 °C	15 sec
5. Erstellung einer Schmelzkurve		

Die Schritte 1 und 5 wurden stets nur einmalig absolviert, während die Schritte 2-4 vierzigmal zyklisch wiederholt wurden. Die Schmelzkurve diente der Überprüfung der Spezifität der Amplifikation. Die Datenerfassung erfolgte stets in Schritt 3.

Für jede Transkriptanalyse wurde zunächst die relative Expression verschiedener Referenzgene für alle cDNA-Proben bestimmt, um die stabilsten Referenzgene für das vorliegende Probenset zu identifizieren. Diese wurden dann für die Normalisierung der qRT-Ergebnisse verwendet. Im Falle der *Stem-loop*-qRT-Analysen wurden für die Wildtyp-Kontrollen zunächst mehrere cDNA-Synthesen mit 3'-Oligonukleotiden verschiedener Referenzgene durchgeführt, in nachfolgenden qRT-PCRs das beste ausgewählt und mit diesem die cDNA-Synthesen aller Proben durchgeführt. *TAFII15* stellte sich dabei immer als das stabilste Referenzgen heraus.

Die Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgte meist nach Vandesompele *et al.* (2002). Bei der Bestimmung der Expression der Zielgen-Mimikry-Transgene wurde aus Mangel einer Kontrolle die $40\text{-}\Delta\text{Ct}$ -Methode für die Auswertung herangezogen, wie sie in Morcuende *et al.* (2007) beschrieben ist.

2.2.4.12. Bestimmung der CKX-Enzymaktivität (modifiziert nach Galuszka *et al.* (2007))

Die Transgene *p35S:CKX1* und *p35S:CKX1-4xMyc* wurden mittels *Agrobacterium tumefaciens* in Blättern von *Nicotiana benthamiana* exprimiert (s. Abschnitt 2.2.3.1). Aus den infiltrierten Blättern wurden Blattscheiben ausgestanzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser zu feinem Pulver zermahlen. Das zerkleinerte Blattmaterial wurde in 1,5-2,0 ml Proteinextraktionspuffer (200 mM Tris-HCl [pH 6,8]; 0,3 % [v/v] Triton X-100; 1 Tablette *Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free* [Roche, Rotkreuz, CH] pro 10 ml Puffer; in ddH₂O) pro Gramm Frischgewicht aufgenommen und für 20 min schüttelnd auf Eis inkubiert. Um die gelösten Proteine von den Zelltrümmern zu trennen, wurde der Pflanzenextrakt für 15 min bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) bestimmt.

Der Reaktionsansatz für die Bestimmung der CKX-Aktivität bestand aus 200 µl des Proteinextrakts, 500 µM Ferricyanid als Elektronenakzeptor, 100 mM McIlvaine-Puffer (pH 5,0) (McIlvaine, 1921) und 250 µM Isopentenyladenosinribosid (gelöst in DMSO) als Substrat. Für den Nullwert der Reaktion wurde darüber hinaus jeweils ein Reaktionsansatz mit DMSO statt Cytokinin pipettiert. Die Reaktionsansätze wurden für zwei Stunden bei 37 °C im Dunkeln und bei 900 rpm inkubiert und anschließend durch Zugabe von 300 µl 40 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA) abgestoppt. Um die ausgefällten Proteine zu entfernen, wurden die Ansätze für 5 min bei 16000 g und RT zentrifugiert und jeweils 850 µl des Überstandes in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Ansätze wurden jeweils mit 200 µl 2 % (w/v) 4-Aminophenol (in 6 % [v/v] TCA) gemischt und nach 2 min Inkubation wurde mit Hilfe eines Photometers und unter Verwendung der Nullwertkontrolle als Blankwert die Absorption bei 352 nm gemessen, um die Menge der entstandenen Schiff'schen Base zu bestimmen. Die erhaltenen Werte wurden auf die jeweils eingesetzte Proteinmenge bezogen.

2.2.5. Messung physiologischer Parameter

2.2.5.1. Messung von Cytokininmetaboliten in Pflanzenmaterial (nach Novák *et al.* (2008))

Für die Messung der Cytokininmetabolite wurden die zu analysierenden Pflanzen auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen (s. Abschnitt 2.1.8.1). Etwa 20 mg Sprossmaterial sieben Tage alter Keimlinge wurden vereinigt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Bearbeitung bei -80 °C

gelagert. Die Messungen wurden von Dr. Ondrej Novák (Palacký Universität, Olomouc, Tschechien) durchgeführt. Pro Genotyp wurden vier biologische Replikate analysiert.

2.2.5.2. Messung von Gibberellinmetaboliten in Pflanzenmaterial (nach Urbanová *et al.* (2013))

Auch für die Messung der Gibberellinmetabolite wurden die zu analysierenden Pflanzen auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen (s. Abschnitt 2.1.8.1) und vier biologische Replikate analysiert. Ganze Rosetten 15 Tage alter Pflanzen wurden geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Die Messungen wurden von Dr. Danuše Tarkowská (Palacký Universität, Olomouc, Tschechien) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Für die Untersuchung autonomer und nicht-autonomer Wirkungen von Cytokinin auf das Sprossapikalmeristem (SAM) wurden Promotoren mit spezifischer Expression in distinkten Domänen des SAMs sowie in angrenzenden Regionen ausgewählt (Tab. 26). Die Promotoren wurden mit Genen kombiniert, deren Produkte Einfluss auf Metabolismus und Transduktion des Cytokininsignals nehmen, um Aufschluss über den Ort und den Mechanismus der Cytokininwirkung zu erhalten. Während die Manipulation der Signalkaskade eher einen lokalen Effekt in der entsprechenden Domäne erzeugen sollte, ist bei Veränderung des Cytokininspiegels ein weitreichenderer Effekt vorstellbar, da durch Diffusion des Phytohormons Gradienten und damit Effekte über die Expressionsdomäne des Transgens hinaus möglich sind.

Tab. 26: Klonierte Promotoren und ihre Expressionsdomänen.

Gen	Lokus	Promotor-fragment	Expressionsdomäne	Referenz
<i>AINTEGUMENTA (ANT)</i>	AT4G37750	-4229 bis -1	Primordien von Kotyledonen, Blättern, Blüten und Blütenorganen	Elliott <i>et al.</i> (1996); Grandjean <i>et al.</i> (2004)
<i>ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER 1 (ATML1)</i>	AT4G21750	-5488 bis -1581	L1-Schicht von vegetativen, Infloreszenz- und Blütenmeristemen; Protoderm von Organprimordien und junger Organe; Epidermis der Wurzel- und Seitenwurzelspitzen; s. auch Abschnitt 3.1.2 und 3.1.4.1	Sessions <i>et al.</i> (1999); Grandjean <i>et al.</i> (2004); Takada & Jürgens (2007)
<i>CUP-SHAPED COTYLEDON 3 (CUC3)</i>	AT1G76420	-4353 bis -1	Grenzschicht von Kotyledonen, Blättern und zwischen Blütenorganen	Vroemen <i>et al.</i> (2003); Hibara <i>et al.</i> (2006)
<i>HIGH MOBILITY GROUP (HMG)</i>	AT1G04880	-2942 bis -1	Äußere Zellschicht (L1) der zentralen Zone des SAMs, in der sich die Stammzellen befinden, aber auch schwächer im Protoderm des restlichen Meristems und von Organprimordien	Yadav <i>et al.</i> (2009), Yadav <i>et al.</i> (2014)
<i>HOMEODOMAIN GENE 8 (HB-8)</i>	AT4G32880	-1711 bis -1	Prokambium von Embryo und sich entwickelnden Organen; während der Regeneration der Vaskularstränge; nicht in vollständig ausdifferenziertem Leitgewebe	Baima <i>et al.</i> (1995)
<i>PROTODERMAL FACTOR 1 (PDF1)</i>	AT2G42840	-380 bis -1	L1-Schicht von vegetativen, Infloreszenz- und Blütenmeristemen; Protoderm von Organprimordien und junger Organe; nicht in voll entwickelten Organen; s. auch Abschnitt 3.1.1	Abe <i>et al.</i> (2001)
<i>MICRORNA165A (MIR165A)</i>	AT1G01183	-1450 bis -129	Epidermis von Embryos, Blattprimordien und sich entwickelnden Blättern; nicht in der L1-Schicht des Sprossapikalmeristems; s. auch Abschnitt 3.1.1	Yao <i>et al.</i> (2009)

Der klonierte Promotorbereich ist relativ zum Startcodon bzw. im Falle von *MIR165A* relativ zum Transkriptbeginn angegeben.

Die Reduktion des Cytokininstatus wird durch Senkung des Cytokininspiegels (CKX1) bzw. Hemmung der Signaltransduktion (ARR1-SRDX) erreicht. Bei dem Fusionsprotein ARR1-SRDX handelt es sich um eine dominante Repressorvariante von ARR1 (Heyl *et al.*, 2008). SRDX ist ein modifiziertes Aminosäure-Motiv transkriptioneller Repressoren der Klasse-II-ERFs (*Ethylene Response Factors*) (Ohta *et al.*, 2001; Hiratsu *et al.*, 2003). Die Fusion dieses Motivs an transkriptionelle Aktivatoren verwandelt diese in dominante Repressoren (Hiratsu *et al.*, 2003). Da diese auch Einfluss auf andere Mitglieder der gleichen Proteinfamilie ausüben, wird potenzielle Redundanz umgangen.

Die Erhöhung des Cytokininstatus erfolgt durch Expression von *LOG4*, da eine Verstärkung der Biosynthese mittels *IPT7* keinen Effekt erzielte (Daten nicht gezeigt). Durch die Nutzung von *LOG4* ist die Erhöhung aktiver Cytokinine von dem Vorhandensein der Ribosid-5'-Monophosphat-Vorstufen als Substrat abhängig (Kurakawa *et al.*, 2007). Ursprünglich war auch *rock2*, eine *Gain-of-function*-Variante des Cytokininrezeptors AHK2 (Bartrina, 2006; Jensen, 2013), Teil der Untersuchungen. *Rock2* vermittelt konstitutiv eine Cytokininantwort, auch in Abwesenheit des Phytohormons (Jensen, 2013). Da die resultierenden Pflanzen aber z. T. starke Gewebewucherungen und ein Fertilitätsproblem aufwiesen (Daten nicht gezeigt), wurden diese aus den Untersuchungen ausgeklammert.

Die interessanteste Pflanzengruppe entstand durch Manipulation des Cytokininstatus in der Epidermis durch Nutzung des Promotors des *ATML1*-Gens. Die Pflanzen zeichneten sich durch einen cytokinin-abhängigen und vergleichsweise stabilen und uniformen Phänotyp aus, der sich auch über mehrere Generationen nicht abschwächte. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich daher mit der Charakterisierung der *pATML1*-Linien und der Rolle von Cytokinin in der Epidermis bei der Determination der Organgröße. Die übrigen generierten *Arabidopsis*-Linien wurden größtenteils nur oberflächlich untersucht und werden hier nicht weiter behandelt. Tab. S1 gibt einen Überblick über beobachtete Phänotypen dieser Linien. Im Zuge der Analysen der *pATML1*-Linien offenbarte sich eine bisher unbekannte Funktion von Cytokinin bei der Regulation des Übergangs von der juvenilen in die adulte vegetative Entwicklungsphase. Der Einfluss von Cytokinin auf Entwicklungsübergänge wird im zweiten Teil dieser Arbeit behandelt.

Alle Untersuchungen wurden mit homozygoten Linien durchgeführt. In den Abbildungen werden Genotypen mit einem höheren Cytokininstatus stets durch blaue Farbe angezeigt und sind links vom Wildtyp (schwarz) angeordnet, während Linien mit einem verringerten Cytokininstatus rot und rechts neben der Wildtypkontrolle dargestellt sind.

3.1. Phänotypische und molekularbiologische Analyse von transgenen Pflanzen mit verändertem Cytokininstatus in der Epidermis

3.1.1. Überprüfung der Funktionalität der klonierten Gene

CKX1 und *ARR1-SRDX* wurden für eventuelle biochemische Untersuchungen mit einem vierfachen Myc-Tag (4xMyc) versehen. Im Falle von *LOG4* wurde die Kodierungssequenz verwendet, auf einen Tag wurde verzichtet. Tags können funktionelle Domänen und/oder Lokalisationssignale maskieren oder post-translationale Modifikationen verhindern und damit die Funktionalität der kodierten Proteine beeinträchtigen. Als potenzielle Kontrollen und vor allem um sicherzustellen, dass die Myc-Fusion (*CKX1* und *ARR1-SRDX*) bzw. die Verwendung der Kodierungssequenz (*LOG4*) keinen Einfluss auf die Funktionalität der verwendeten Transgene hat, wurden zunächst Überexpressionskonstrukte unter Verwendung des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (*Cauliflower Mosaic Virus, CaMV*) generiert. Der 35S-Promotor gewährleistet eine starke konstitutive und ubiquitäre Expression (Benfey & Chua, 1990).

Für p35S:LOG4 (35L) wurden zwölf Primärtransformanten identifiziert, von denen drei noch während der vegetativen Phase starben und von denen somit keine Samen gewonnen werden konnten. In der T2-Generation konnten auf Selektionsmedium von den verbleibenden neun Linien sechs mit einem Spaltungsverhältnis von 3:1 (überlebende:tote Pflanzen) identifiziert werden, was in allen Fällen auf eine Einzelinsertion hindeutet. Trotz der verstärkten Cytokininbiosynthese durch Expression des *LOG4*-Gens ähneln die 35L-Linien eher cytokinindefizienten Pflanzen (Abb. 6A und Abb. 6B) (Kuroha *et al.*, 2009). Sichtbar sind vor allem das verringerte Sprosswachstum und ein verzögerter Blühbeginn (Abb. 6A). Außerdem konnte eine reduzierte Apikaldominanz und größere Samen beobachtet werden. Kuroha *et al.* (2009) dokumentierten darüber hinaus eine Zunahme des Chlorophyllgehalts in den Blättern und eine Verzögerung der Blattseneszenz, diese Merkmale wurden hier jedoch nicht analysiert. Der im Vergleich zu *IPT*-überexprimierenden Pflanzen eher milde Phänotyp (Zubko *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2006; Kuroha *et al.*, 2009) zeigt, dass LOG-Enzyme für die *de-novo*-Cytokininbiosynthese nicht geschwindigkeitsbestimmend sind. Für den Befund, dass der 35L-Phänotyp demjenigen cytokinindefizienter Pflanzen ähnelt, geben Kuroha *et al.* (2009) die Reduktion von Cytokinin des *tZ*-Typs im Spross von p35S:LOG4-Pflanzen und potenzielle Unterschiede der biologischen Funktionen von *tZ* und *iP* als mögliche Erklärungen an. Unterstützt wird diese Hypothese durch Experimente an *loss-* und *gain-of-function*-Mutanten der *CYP735A*-Gene, deren Genprodukte für die Umwandlung von *iP*- in *tZ*-Cytokinin verantwortlich sind (Kiba *et al.*, 2013).

Transgene Pflanzen, die eine unmarkierte Version von *ARR1-SRDX* unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimieren, zeigen phänotypische Veränderungen, die auch bei anderen cytokinindefizienten Pflanzen auftreten, wie z. B. verstärktes Wurzelwachstum, größere Samen und stark verkleinerte Blätter. Diese resultieren aus der Hemmung der Cytokininsignalkaskade (Heyl *et al.*, 2008). Die

Expression von *p35S:ARR1-SRDX-4xMyc (35AS)* (Abb. 6D) führt zu einem stark reduzierten Rosetten- und Stengeldurchmesser (Abb. 6C), das Wurzelwachstum wurde nicht analysiert. Die Größe der Rosettenblätter der 35AS-Linien ist nicht ganz so stark reduziert wie die der publizierten Linien, was auf die Myc-Fusion zurückzuführen sein könnte, aber auch das Resultat unterschiedlicher Wachstumsbedingungen oder einer schwächeren Transgenexpression sein könnte. Für 35AS konnten insgesamt nur zehn Primärtransformanten identifiziert werden (darunter sechs mit Einzelinsertion), was zum einen in einer schlechten Transformationsrate, zum anderen aber auch in der Letalität einer zu starken Transgenexpression begründet sein könnte. Im Gegensatz zu Pflanzen, die die unmarkierte Variante exprimieren, blühen 35AS-Pflanzen später als der Wildtyp. Da *p35S:ARR1-SRDX* und 35AS nicht für einen direkten Vergleich gemeinsam angezogen wurden, ist hierfür ebenfalls keine gesicherte Erklärung möglich. Die Verzögerung der Blühinduktion ist aber eine oft beobachtete Folge von Cytokinindefizienz (Werner *et al.*, 2003; Hutchison *et al.*, 2006; Miyawaki *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006; Kuroha *et al.*, 2009). Es kann geschlussfolgert werden, dass die 35AS-Expression Cytokinindefizienz verursacht und die Fusion des *Myc-Tags* an das SRDX-Repressormotiv möglicherweise eine Abschwächung, aber keine Hemmung der Funktionalität verursacht.

Die C-terminale Fusion eines *Tags* an *CKX1* durch klassische Klonierung mittels Restriktionsschnittstellen führt zu einem Verlust der Proteinaktivität (Henriette Weber, persönliche Information). Für die Generierung der Konstrukte dieser Arbeit wurde hingegen das Gateway®-System von Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA) verwendet. Durch die für die Rekombinationsreaktion notwendigen *attachment sites* entstehen längere Abschnitte zwischen den verknüpften Sequenzen als durch die Verwendung von kurzen Restriktionsschnittstellen. Die längere verbindende Aminosäuresequenz zwischen *CKX1* und dem *Myc-Tag* könnte dafür sorgen, dass keine sterische Inhibition stattfindet bzw. funktionelle Domänen oder andere für die Funktion des Proteins wichtige Abschnitte für Substrate, Interaktoren oder Modifikatoren zugänglich bleiben. Um die Funktionalität des *p35S:CKX1-4xMyc*-Transgen zu testen, wurde es einem CKX-Enzymaktivitätstest (Galuszka *et al.*, 2007) unterzogen. Dazu wurden das *p35S:CKX1-4xMyc*-Transgen sowie eine unmarkierte Variante zusammen mit dem *Silencing Inhibitor* p19 transient in *Nicotiana-benthamiana*-Blättern exprimiert und die Enzymaktivitäten in Proteinextrakten unter Verwendung von *N*⁶-Isopentenyladenin-*N*⁹-Glucosid (iP9G) als Substrat bestimmt. Als Kontrolle wurde der Proteinextrakt aus Blättern verwendet, die nur mit dem p19-Stamm infiziert wurden. Beide Konstrukte zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine stark erhöhte CKX-Aktivität (Abb. 6E), die Myc-markierte CKX1-Variante ist somit funktional.

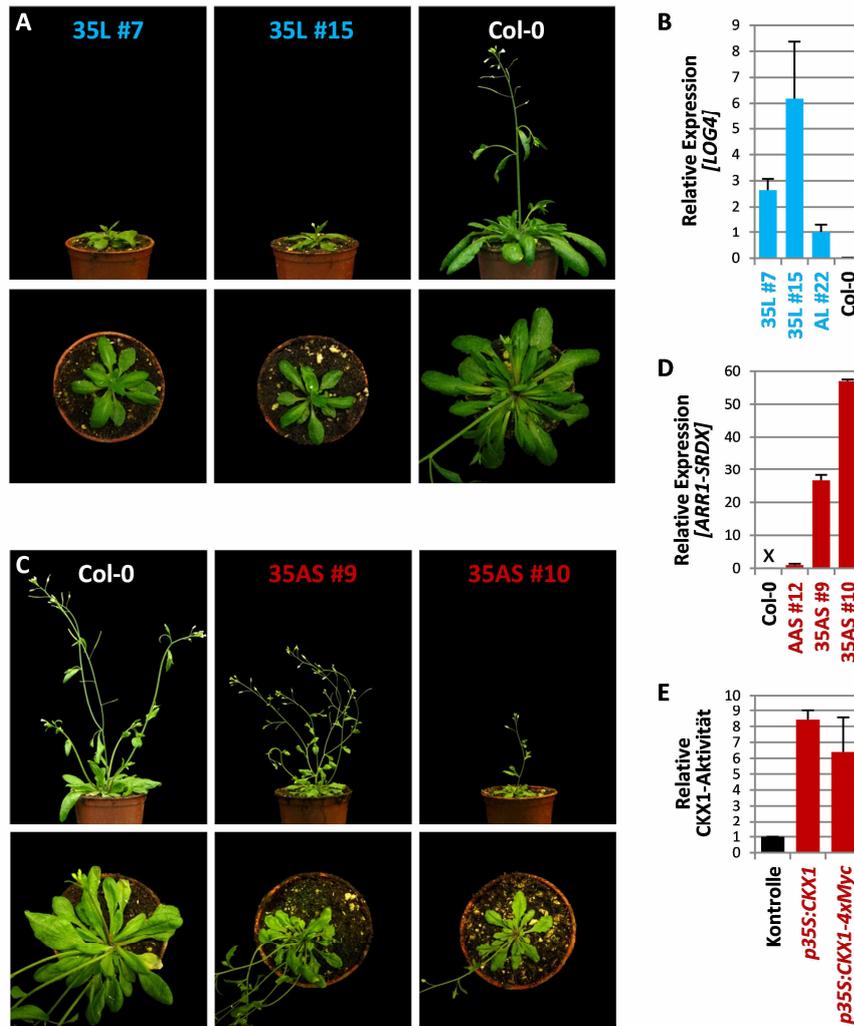


Abb. 6: Überprüfung der Funktionalität der klonierten Gene. (A) Phänotyp transgener p35S:LOG4(35L)-*Arabidopsis*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (36 TNK). **(B)** Expressionslevel von *LOG4* in Sprossmaterial 15 Tage alter Pflanzen; dargestellt sind relative Werte von je zwei unabhängigen Linien von 35L im Vergleich zu pATML1:LOG4 (AL) und Wildtyp (Col-0); AL #22 wurde auf 1 gesetzt. **(C)** Phänotyp transgener p35S:ARR1-SRDX-4xMyc(35AS)-*Arabidopsis*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (28 TNK). **(D)** Expressionslevel von *ARR1-SRDX* in Sprossmaterial 15 Tage alter Pflanzen; dargestellt sind relative Werte von je zwei unabhängigen Linien von 35AS im Vergleich zu pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc (AAS); AAS #12 wurde auf 1 gesetzt; x = nicht detektiert. **(E)** Enzymaktivitäten einer unmarkierten und einer Myc-markierten CKX1-Variante relativ zur Kontrolle; die Konstrukte wurden transient in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert und die CKX1-Aktivitäten in Proteinextrakten unter Verwendung von iP9G als Substrat bestimmt. Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. **(B, D, E)** Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 2). **(B, D)** *PP2AA2* und *TAFII15* dienen als Referenzgene.

3.1.2. Auswahl eines geeigneten Epidermis-spezifischen Promotors

Für die ektopische Expression der Gene *LOG4*, *ARR1-SRDX* und *CKX1* in der Epidermis wurden insgesamt drei verschiedene Promotoren mit leicht unterschiedlichem Expressionsmuster ausgewählt und getestet. Laut verfügbarer Transkriptomdaten werden die von diesen Promotoren regulierten Gene (*ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER 1* [*ATML1*], *MICRORNA165A* [*MIR165A*] und *PROTODERMAL FACTOR 1* [*PDF1*]) nicht durch Cytokinin reguliert (Brenner *et al.*, 2012; Bhargava *et al.*, 2013), sodass die

Veränderung des Cytokininstatus in den Expressionsdomänen keinen Einfluss auf die Expression haben sollte.

Für *pATML1* wurde ein 3908-bp-langes, 1581 bp 5'-wärts des Startcodons beginnendes Promotorfragment verwendet, das in etwa Fragment 2 einer Promotoranalyse entspricht, welches die stärkste und gleichmäßigste Expression zeigte (Sessions *et al.*, 1999) und deshalb seither in vielen Studien genutzt wird, z. B. Grandjean *et al.* (2004), Savaldi-Goldstein *et al.* (2007), Takada & Jürgens (2007) und Takada *et al.* (2013).

Die Aktivität des *ATML1*-Promotors ist bereits nach der ersten transversalen Teilung der Zygote in Apikal- und Basalzelle detektierbar (Lu *et al.*, 1996; Takada & Jürgens, 2007). Die Expression ist bis zum 8-Zell-Stadium in allen Zellen des Proembryos erkennbar, ab dem 16-Zell-Stadium wird eine Begrenzung des Signals auf das Protoderm sichtbar (Lu *et al.*, 1996; Sessions *et al.*, 1999; Takada & Jürgens, 2007). Nach der Samenkeimung ist *ATML1* in der L1-Schicht des SAMs und der Blattprimordien und in der Epidermis junger Blätter exprimiert (Abb. 7) (Lu *et al.*, 1996). In Abb. 7 ist zum einen die spezifische β -Glucuronidase-Aktivität in der L1-Schicht und im Protoderm junger Organe von *pATML1*:GFP-GUS-Pflanzen zu sehen (Abb. 7A), zum anderen zeigt der Vergleich 12 und 16 Tage alter Pflanzen, dass der Promotor nur in sehr jungen Blättern aktiv ist (Abb. 7B und Abb. 7C).

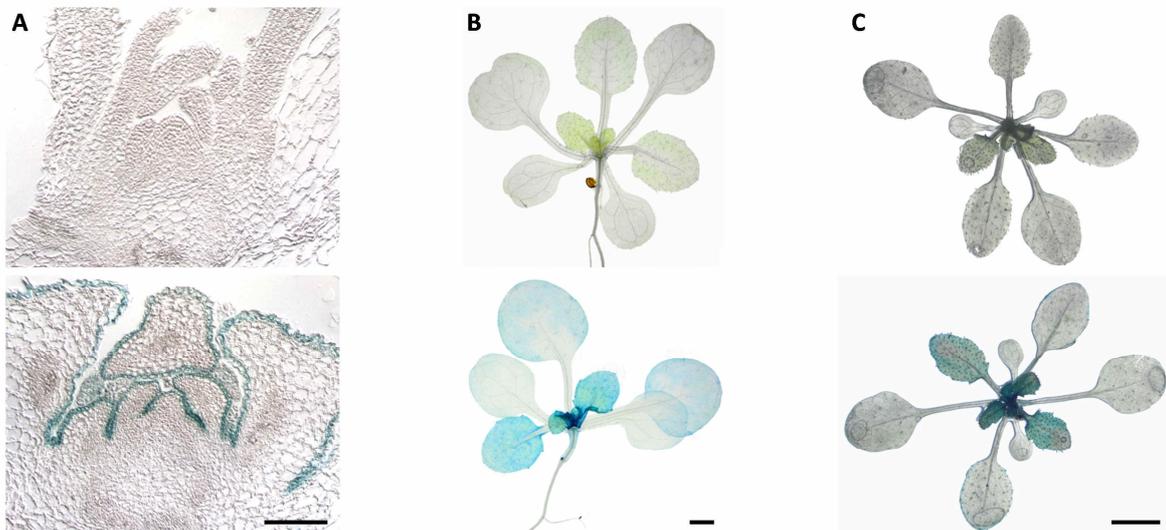


Abb. 7: Promotoraktivität von *pATML1* im Spross. (A) Longitudinale Schnitte von Col-0 (oben) und *pATML1*:GFP-GUS #23 (unten) durch die Meristemregion zehn Tage alter Keimlinge (7 h GUS-Färbung; Maßstab = 100 μ m). (B) 12 Tage alte Keimlinge (Col-0 oben, *pATML1*:GFP-GUS #23 unten; 12 h GUS-Färbung; Maßstab = 1 mm). (C) 16 Tage alte Pflanzen (Col-0 oben, *pATML1*:GFP-GUS #23 unten; 12 h GUS-Färbung; Maßstab = 5 mm). Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Es wurden drei unabhängige Linien sowie jeweils mindestens zehn Pflanzen analysiert.

Der *ATML1*-Promotor wurde mit *LOG4*, *CKX1* und *ARR1-SRDX* kombiniert und in *Arabidopsis-thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Col-0 transformiert. Es wurden nach der Basta-Selektion pro Transgen fünfzig Primärtransformanten ausgewählt. Für *pATML1*:*CKX1*-4xMyc (AC) und *pATML1*:*LOG4* (AL) konnten

bereits in der T1-Generation veränderte, uniforme Phänotypen beobachtet werden, für *pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc* (AAS) war zunächst kein offensichtlicher Phänotyp feststellbar. In der Folgegeneration wurden für *pATML1:CKX1-4xMyc* 39 unabhängige Linien auf Selektionsmedium ausgelegt, davon zeigten zwanzig ein 3:1-Verhältnis, was auf einen einzelnen Insertionsloкус in diesen Linien hindeutet. Für AL wurden 27 unabhängige Linien auf ihr Segregationsverhältnis untersucht, von denen 24 Linien ein Spaltungsverhältnis von 3:1 zeigten. Von 35 getesteten AAS-Linien konnten 17 Einzelsinsertionsmutanten identifiziert werden.

Die Expression von *pATML1:LOG4* führt zu einer sichtbaren Vergrößerung der Blattfläche und der Rosette; zudem blühen die Pflanzen früher als der Wildtyp (Abb. 8A). AC-Pflanzen haben hingegen kleinere unflexible und an den Rändern eingerollte Blätter, eine kleinere Rosette und blühen verspätet (Abb. 8A). In den Abschnitten 3.1.4.2 und 3.1.7 folgt eine genauere Untersuchung des Sprosswachstums und des Blühverhaltens. Für beide Konstrukte wurde jeweils eine stärker und eine schwächer exprimierende Linie ausgewählt (Abb. 8B und Abb. 8C). Interessant ist, dass *pATML1:LOG4* im Gegensatz zu *p35S:LOG4* zu einer größeren Rosette führt (Abb. 6A und Abb. 8A), was auf die gewebsspezifische Expression oder aber auf die 2,5- bis 6-fach geringere *LOG4*-Expression (Abb. 6B) zurückzuführen sein könnte.

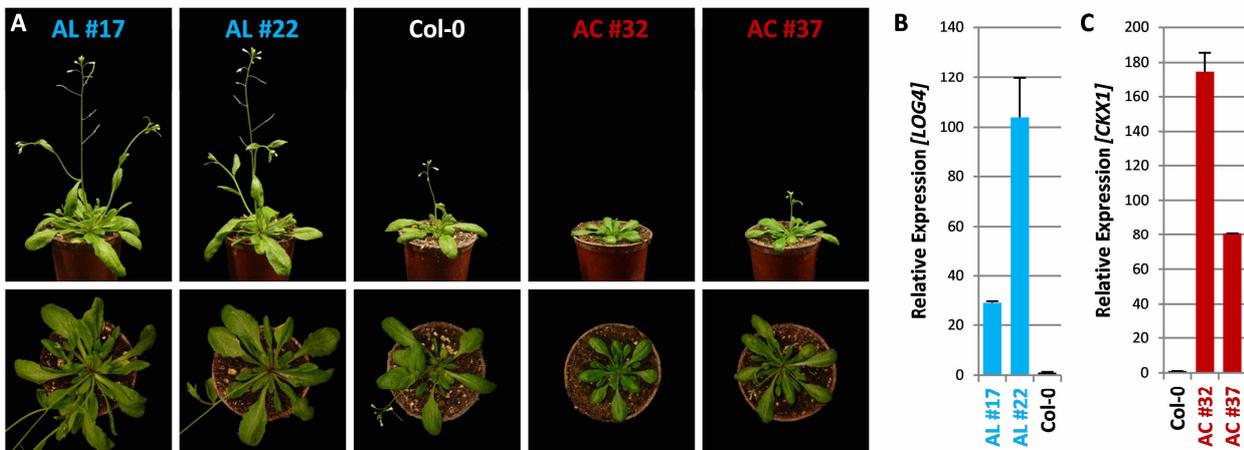


Abb. 8: Die ektopische Expression von *LOG4* und *CKX1* unter der Kontrolle des Promotors *pATML1* beeinflusst Rosettengröße und Blühzeitpunkt. (A) Phänotyp transgener *pATML1:LOG4*(AL)- und *pATML1:CKX1-4xMyc*(AC)-*Arabidopsis*-Pflanzen im Vergleich zu Col-0 (31 TNK). (B) Expressionslevel von *LOG4* in Sprossmaterial elf Tage alter AL-Pflanzen; (C) Expressionslevel von *CKX1* in Sprossmaterial elf Tage alter AC-Pflanzen; dargestellt sind relative Werte von je zwei unabhängigen Linien im Vergleich zum Wildtyp, welcher auf 1 gesetzt wurde.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. (B, C) Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 2); *PP2AA2* diente als Referenzgen.

Die lokale Hemmung der Cytokininsignaltransduktion in der Epidermis durch *ARR1-SRDX* führt nur zu einer leichten Verkleinerung der Rosette, das Blühverhalten ist nicht verändert (Abb. 9A, Abschnitte 3.1.4.2 und 3.1.7). Das Transgen wird in den AAS-Linien #12 und #14 exprimiert (Abb. 9) und in den

ARR1-SRDX-Überexpressionslinien ist eine 27- bis 57-fach stärkere Transgenexpression als in den AAS-Linien messbar (Abb. 6D).

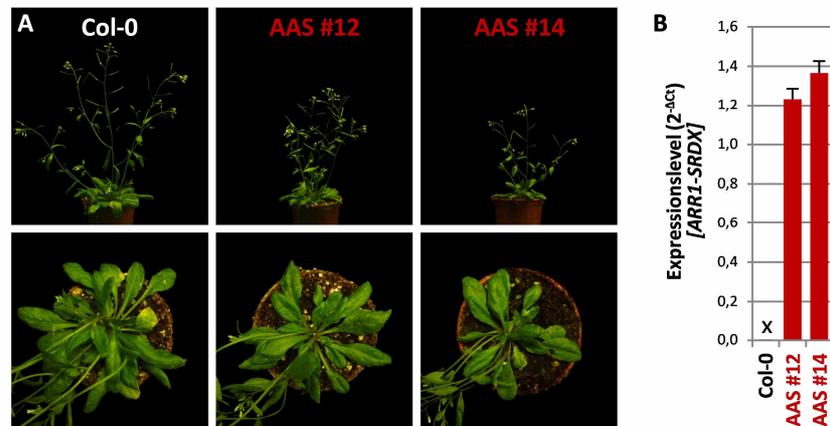


Abb. 9: Die Expression von *ARR1-SRDX* unter der Kontrolle des Promotors *pATML1* hat nur geringe Auswirkungen auf das Sprosswachstum. **(A)** Phänotyp transgener *pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc(AAS)-Arabidopsis*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (36 TNK). **(B)** Expressionslevel von *ARR1-SRDX* in Sprossmaterial sieben Tage alter AAS-Keimlinge; dargestellt sind normalisierte Werte von zwei unabhängigen Linien; x = nicht detektierbar. Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. **(B)** Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3); *PP2AA2* und *TAFII15* dienten als Referenzgene.

MIR165A ist in der abaxialen Epidermis von Embryos, Blattprimordien und sich entwickelnder Blätter exprimiert, jedoch nicht in der L1-Schicht des Sprossapikalmeristems (Yao *et al.*, 2009). Es wurde ein 1322-bp-langes Promotorfragment verwendet, dem ein regulatorisches *cis*-Element fehlt, welches die Expression in der adaxialen Epidermis verhindert (Yao *et al.*, 2009). Die klonierte Sequenz entspricht Fragment T5 aus der Publikation und sollte somit eine Genexpression in der gesamten Blattepidermis vermitteln (Yao *et al.*, 2009). Es wurden transgene *pMIR165A:GFP-GUS*-Linien erzeugt, um mittels GUS-Färbung das Expressionsmuster zu überprüfen. Leider konnte im Spross 12- bzw. 16-Tage-alter Pflanzen auch zwölf Stunden nach Start der Reaktion keine GUS-Färbung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), allerdings wurden auch nur fünf unabhängige Linien getestet. Es konnte eine Färbung in der Vaskulatur von Primär- und Seitenwurzeln beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), das Transgen wurde somit in den Linien exprimiert.

Die Expression von *LOG4* und *CKX1* unter der Kontrolle des *MIR165A*-Promotors führt nur zu einem sehr schwachen Phänotyp: *pMIR165A:LOG4(ML)*-Pflanzen blühen etwas früher, *pMIR165A:CKX1-4xMyc (MC)* etwas später als der Wildtyp (Abb. 10A und Abb. 10B), ansonsten waren keine offensichtlichen Veränderungen erkennbar. In den MC-Linien konnte mittels quantitativer *Real-time*-PCR eine bis zu 30-fache *CKX1*-Expression im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 10D), die damit deutlich schwächer ist als in den AC-Linien (Abb. 8C), welche wiederum eine deutliche Reduktion des Sprosswachstums zeigen (Abb. 8A). Die Abwesenheit auffälliger Merkmalsveränderungen in den MC-Linien könnte somit

auf die vergleichsweise schwache *CKX1*-Überexpression zurückzuführen sein. Dagegen spricht allerdings, dass in den ML-Linien eine bis zu 55-fache Genexpression von *LOG4* im Vergleich zum Wildtypniveau gemessen wurde (Abb. 10C), womit die *LOG4*-Transkriptmenge höher war als die, die in AL #17 nachgewiesen wurde (Abb. 8B) und trotzdem kein vergleichbarer Sprossphänotyp beobachtet werden konnte. Unter der Voraussetzung, dass die Gene tatsächlich in der Epidermis von MC- und ML-Pflanzen exprimiert werden (in den getesteten GUS-Linien war die Expression möglicherweise zu schwach), könnte die Abwesenheit eines Sprossphänotyps in MC- und ML-Linien somit auf das spezifische Expressionsmuster des *MIR165A*-Promotors zurückzuführen sein. Da das *pMIR165A*-Expressionsmuster nicht bestätigt werden konnte und die Messung der Cytokininmetabolite in jeweils einer stark exprimierenden Linie von MC und ML keine auffälligen Unterschiede zum Wildtyp zutage förderte (Daten nicht gezeigt), wurden die MC- und ML-Linien nicht weiter untersucht.

Der Promotor des Gens *PDF1* ist wie *pATML1* in jungen, proliferierenden Organen aktiv. *PDF1* ist bereits in der frühen Embryonalentwicklung aktiv, ab dem Herzstadium ist die Expression nur noch auf die äußere Zellschicht begrenzt (Abe *et al.*, 1999). Das Gen ist in der L1-Schicht von vegetativen, Infloreszenz- und Blütenmeristemen sowie im Protoderm von Organprimordien und in jungen Organen exprimiert; in voll entwickelten Organen ist keine Expression detektierbar (Abe *et al.*, 1999, 2001). Außerdem ist das Gen in der Spitze auswachsender Seitenwurzeln aktiv (Abe *et al.*, 1999, 2001). In Kotyledonen, im Infloreszenzstengel, in Stengelblättern und in der Primärwurzel ist keine Genaktivität nachweisbar (Abe *et al.*, 1999). Es wurden 380 bp 5'-wärts des Startcodons kloniert, da Promotor-GUS-Linien mit diesem Fragment im Gegensatz zu Linien mit längeren regulatorischen Sequenzen keine Färbung mehr in Seitenwurzelspitzen zeigten (Abe *et al.*, 2001). GUS-Färbung 12 und 16 Tage alter *pPDF1*:GFP-GUS-Pflanzen bestätigte die Promotoraktivität im SAM und in sehr jungen Blättern sowie deren Abwesenheit in der Wurzel (Daten nicht gezeigt).

Trotz der ähnlichen Expressionsmuster von *pPDF1* und *pATML1* konnten für *pPDF1*:*LOG4* (PL) und *pPDF1*:*CKX1*-4xMyc (PC) keine so gravierenden phänotypischen Veränderungen wie für AL- und AC-Pflanzen beobachtet werden. Im Vergleich zum Wildtyp blühen *pPDF1*:*LOG4*(PL)-Pflanzen unter Langtagbedingungen 1,5 bis 3 Tage früher, *pPDF1*:*CKX1*-4xMyc(PC)-Pflanzen 2 bis 2,5 Tage später (Abb. 10A und Abb. 10B, Quantifizierung nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigen die PC-Linien die für *CKX*-Überexpressionspflanzen typischen starren und an den Rändern eingerollten Blätter, eine Reduktion des Rosettendurchmessers konnte aber nicht festgestellt werden (Abb. 10B, Quantifizierung nicht gezeigt). Dies lässt sich durch eine geringere Expressionsstärke des *PDF1*-Promotors im Vergleich zum *ATML1*-Promotor erklären. Für die Messung der *LOG4*- und *CKX1*-Transkriptmengen in *pPDF1*-Linien wurden Apices 15 Tage alter Pflanzen verwendet, für die *pATML1*-Linien wurden ganze Rosetten genutzt, was einen Vergleich schwierig macht. Die unterschiedliche Expressionsstärke könnte durch das Verhältnis der Epidermis zum restlichen Gewebe und der Transkriptmenge des Referenzgens *PP2AA2* zu derjenigen

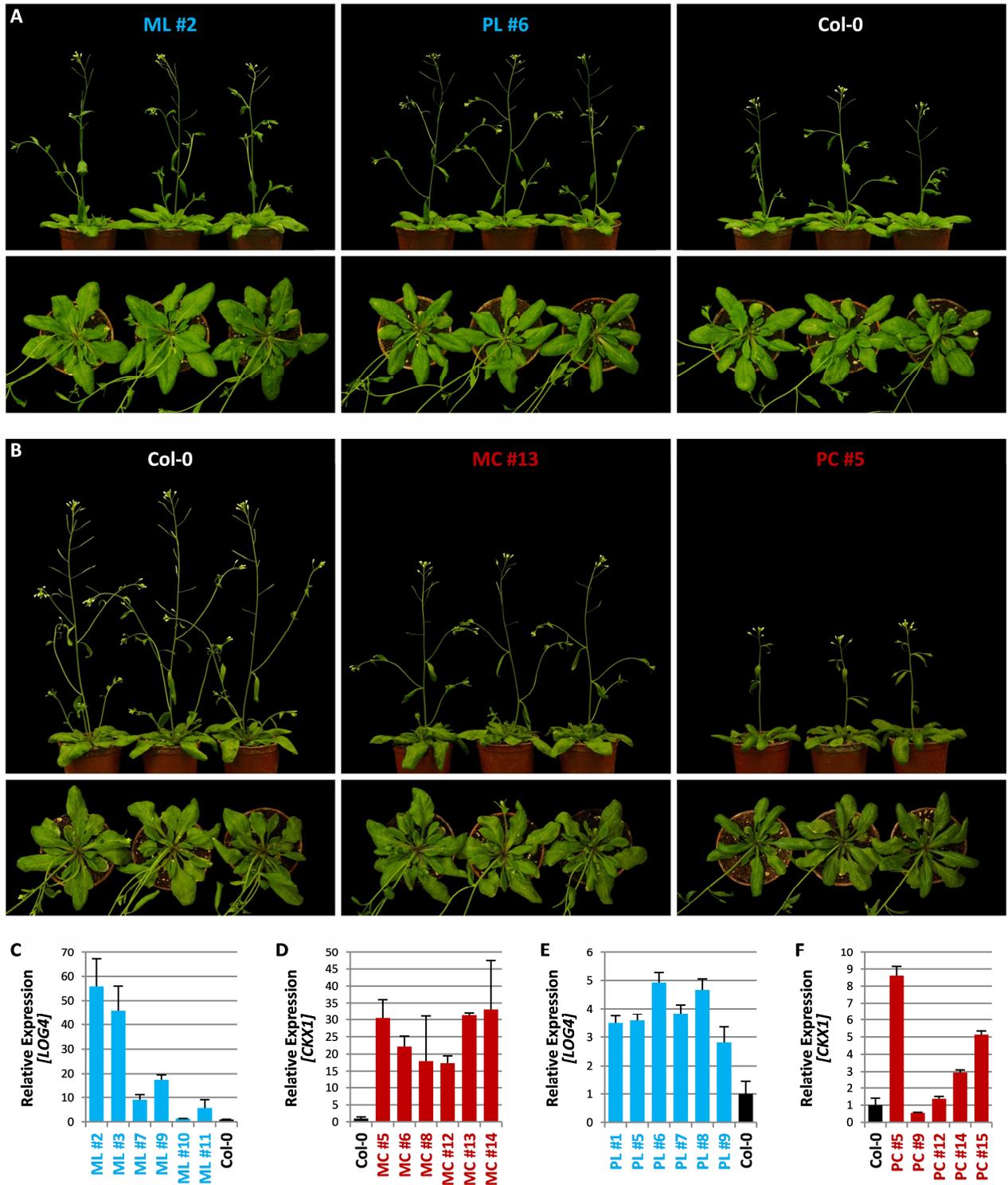


Abb. 10: Die ektopische Expression von *LOG4* und *CKX1* unter der Kontrolle der Promotoren *pMIR165A* und *pPDF1* hat nur geringe Auswirkungen auf das Sprosswachstum. **(A)** Phänotyp transgener *pMIR165A:LOG4*(ML)- und *pPDF1:LOG4*(PL)-*Arabidopsis*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (27 TNK). **(B)** Phänotyp transgener *pMIR165A:CKX1-4xMyc*(MC)- und *pPDF1:CKX1-4xMyc*(PC)-*Arabidopsis*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (25 TNK). **(C-F)** Expressionslevel von *LOG4* bzw. *CKX1* in mehreren unabhängigen ML-, MC-, PL- und PC-Linien; dargestellt sind relative Werte im Vergleich zum Wildtyp (Col-0), welcher auf 1 gesetzt wurde; für die *pMIR165A*-Linien wurde Sprossmaterial elf Tage alter Pflanzen verwendet, für die *pPDF1*-Linien Apices 15 Tage alter Pflanzen. Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. **(A, B)** Es ist jeweils die Linie mit der stärksten Expression des entsprechenden Transgens gezeigt. **(C-F)** Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 2); *PP2AA2* diente als Referenzen.

des getesteten Gens sowie durch das Alter der Pflanze beeinflusst werden. Während aber in den Apices der *pPDF1*-Linien alle Zellen der äußeren Zellschicht die Gene exprimieren sollten, wird die Transkriptmenge durch Nutzung ganzer Rosetten bei den *pATML1*-Linien durch die Abwesenheit der Expression in den älteren Blättern (Abb. 3) stark verdünnt. Dennoch können in den *pATML1*-Linien zwischen 30- und 190-fach höhere Transkriptabundanzen im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden (Abb. 8B und Abb. 8C), während die Genexpression in den Apices der jeweils stärksten PL- und PC-Linie mit einer 5- bzw. 8,5-fachen Erhöhung deutlich niedriger ausfällt (Abb. 10E und Abb. 10F).

3.1.3. Die Expression von *pATML1:LOG4*, *pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc* und *pATML1:CKX1-4xMyc* wirkt sich auf den Cytokininstatus aus

Da die Nutzung des *pATML1*-Promotors die stärksten Phänotypen hervorriefen, wurden diese für die weiteren Untersuchungen verwendet. Um zu zeigen, dass sich die Expression von *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* auf den Cytokinengehalt in den transgenen Linien auswirkt und auf diese Weise die beobachteten phänotypischen Veränderungen hervorruft, wurden Messungen der Cytokinmetabolite in je zwei unabhängigen AL- und AC-Linien durchgeführt. Für die Messungen, die in Kooperation mit Dr. Ondrej Novák (Palacký Universität, Olomouc, Tschechien) durchgeführt wurden, wurde Sprossmaterial sieben Tage alter Keimlinge verwendet. Die Rohdaten sind in Tab. S2 zu finden.

Tab. 27: Cytokinengehalt in *pATML1:LOG4*, Col-0 und *pATML1:CKX1-4xMyc*.

Genotyp		iP-Metabolite	tZ-Metabolite	cZ-Metabolite	DHZ-Metabolite	Gesamt
<i>pATML1:LOG4</i>	#17	35,80 ± 2,08	98,54 ± 4,02	6,56 ± 0,20	2,86 ± 0,13	143,76 ± 6,05
	#22	41,85 ± 1,67	111,27 ± 2,15 **	6,77 ± 0,15	3,92 ± 0,29 ***	163,81 ± 3,97 *
Col-0		36,97 ± 2,22	92,44 ± 6,43	7,35 ± 0,49	2,29 ± 0,13	139,06 ± 8,63
<i>pATML1:CKX1:4xMyc</i>	#32	14,61 ± 0,84 ***	22,67 ± 1,82 ***	2,90 ± 0,15 ***	3,85 ± 0,27 ***	44,03 ± 3,01 ***
	#37	15,61 ± 0,70 ***	24,51 ± 1,29 ***	3,31 ± 0,14 ***	4,44 ± 0,08 ***	47,86 ± 2,08 ***

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Etwa 20 mg Sprossmaterial von sieben Tage alten Keimlingen wurden geerntet und vereinigt. Die Werte sind in pmol/g FG ± Standardfehler angegeben (n = 4). iP-Metabolite = iP (*N*⁶-Isopentenyladenin), iPR (iP-Ribosid), iPRMP (iP-Ribosid-5'-Monophosphat), iP7G (iP-*N*⁷-Glucosid), iP9G (iP-*N*⁹-Glucosid); tZ-Metabolite = tZ (*trans*-Zeatin), tZOG (tZ-*O*-Glucosid), tZR, tZROG (tZ-Ribosid-*O*-Glucosid), tZRMP, tZ7G, tZ9G; cZ-Metabolite = cZ (*cis*-Zeatin), cZOG, cZR, cZROG, cZRMP, cZ9G; DHZ-Metabolite = DHZ (Dihydrozeatin), DHZOG, DHZR, DHZROG, DHZRMP, DHZ7G, DHZ9G. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

In AL-Linie #17 zeigen tZ- und DHZ-Cytokinine leichte Erhöhungen im Vergleich zum Wildtyp, die aber nicht signifikant sind. AL-Linie #22 zeigt Anstiege von iP-, tZ- und DHZ-Formen (Tab. 27). In beiden AL-Linien wird deutlich, dass vor allem die Konzentration der tZ- und DHZ-Metabolite im Vergleich zu den Wildtypwerten zugenommen hat (Tab. 27). In den beiden AC-Linien ist der Gesamtgehalt an Cytokin

auf ein Drittel des Wildtypniveaus reduziert (Tab. 27). Dies ist auf die durchschnittlich geringere Menge der iP- (ca. 41 %), tZ- (ca. 26 %) und cZ-Metabolite (ca. 42 %) zurückzuführen (Tab. 27). Die DHZ-Formen sind hingegen stark erhöht (168 % in Linie #32, 194 % in Linie #37), allerdings wirkt sich dies aufgrund der insgesamt geringen Abundanz der DHZ-Formen nur geringfügig auf den Cytokiningesamtgehalt aus (Tab. 27). Sowohl für die AL- als auch die AC-Linien spiegelt sich die geringere Transgenexpression in Linie #17 bzw. #37 in den Messwerten wider (Tab. 27, Abb. 8B und Abb. 8C).

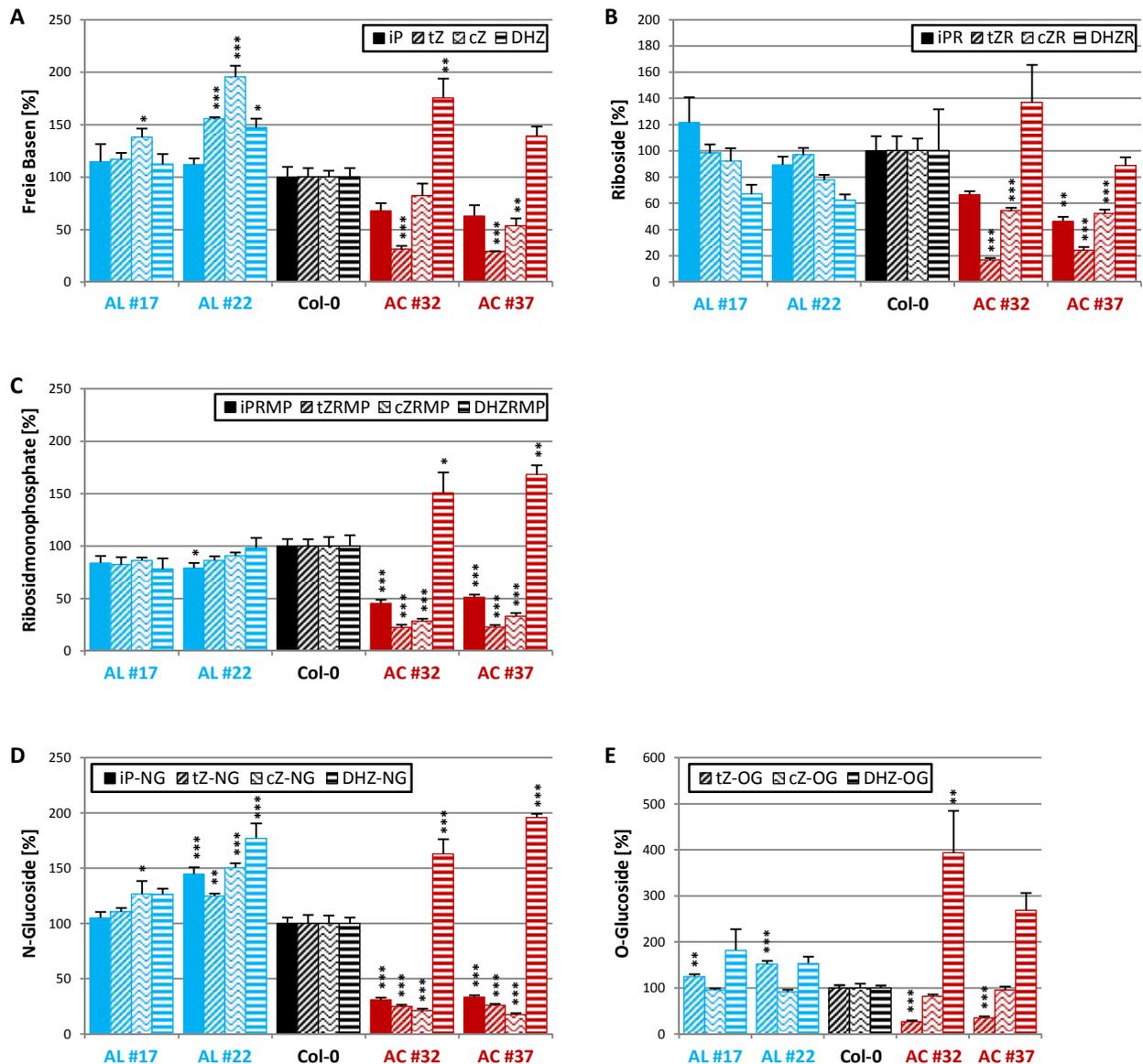


Abb. 11: Auswirkungen der Expression von *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* auf den Cytokiningehalt. Menge an (A) freien Basen, (B) Ribosiden, (C) Ribosidmonophosphaten, (D) N-Glucosiden und (E) O-Glucosiden in Sprossmaterial sieben Tage alter Keimlinge.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Etwa 20 mg Sprossmaterial von sieben Tage alten Keimlingen wurden geerntet und vereinigt. Angegeben sind relative Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4) im Vergleich zum Wildtyp, der auf 100 % gesetzt wurde. iP = N⁶-Isopentenyladenin, tZ = *trans*-Zeatin, cZ = *cis*-Zeatin, DHZ = Dihydrozeatin, NG = N-Glucosid(e) (iP7G, iP9G, tZ7G, tZ9G, cZ9G, DHZ7G, DHZ9G), OG = O-Glucoside (tZOG, tZROG, cZOG, cZROG, DHZOG, DHZROG), R = Ribosid, RMP = Ribosid-5'-Monophosphat. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

Unter den freien Basen ist in den AL-Linien vor allem *cis*-Zeatin erhöht, in der stärkeren Linie #22 sogar um fast das Doppelte im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 11A). In Linie #22 zeigen zudem *tZ* und DHZ einen signifikanten Anstieg (Abb. 11A). Die Konzentrationen der Cytokininribosid-Formen sind kaum verändert, allerdings ist DHZR um fast 40 % reduziert, aufgrund der hohen Standardabweichung des Wildtypwertes ist das statistisch aber nicht signifikant (Abb. 11B). Interessanterweise sind die Ribosid-5'-Monophosphat-Formen, die den LONELY-GUY-Enzymen als Substrat dienen (Kurakawa *et al.*, 2007), kaum reduziert (Abb. 11C). Die *N*-Glucoside und zu einem geringeren Maße auch die *O*-Glucoside sind z. T. deutlich erhöht, in Linie #22 ist dies noch stärker ausgeprägt als in Linie #17 (Abb. 11D und Abb. 11E).

In den AC-Linien ist von den freien Basen besonders *trans*-Zeatin stark reduziert, aber auch die Menge an *iP* und *cZ* ist z. T. deutlich verringert (Abb. 11A). Auch unter den Ribosiden, Ribosidmonophosphaten und *O*-Glucosiden zeigen die *tZ*-Formen die stärkste Reduktion, nur unter den *N*-Glucosiden ist *cZ9G* noch etwas stärker betroffen als *N*-glucosyliertes *tZ* (Abb. 11B-E). Alle gemessenen DHZ-Formen, mit Ausnahme der Ribosidform, zeigen eine deutliche Zunahme im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 11, Tab. 27). Die insgesamt stärkere Zunahme der DHZ-Formen in Linie #37 im Vergleich zu Linie #32 ist auf das Ribosidmonophosphat und die *N*-Glucoside zurückzuführen, die Erhöhung von freiem DHZ, DHZR und *O*-glucosyliertem DHZ ist in Linie #32 stärker als in Linie #37 (Abb. 11, Tab. 27).

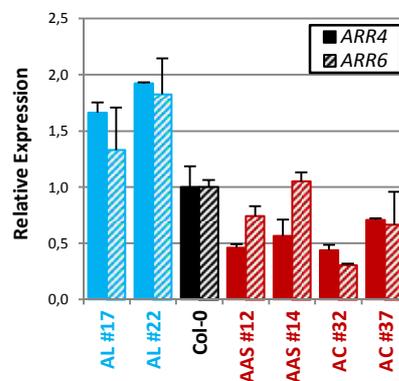


Abb. 12: Auswirkungen der Transgenexpression in *pATML1*-Linien auf die Transkriptabundanz von *ARR4* und *ARR6*. Expressionslevel von *ARR4* und *ARR6* in Sprossmaterial elf Tage alter AL-, Wildtyp-, AAS- und AC-Pflanzen; dargestellt sind relative Werte von je zwei unabhängigen Linien im Vergleich zum Wildtyp (Col-0), welcher auf 1 gesetzt wurde.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 2$); *PP2AA2* und *TAF115* dienten als Referenzgene.

Um zu untersuchen, ob sich Veränderungen der Menge an bioaktiven Cytokinin in AL- und AC-Pflanzen und auch die Hemmung der Cytokinintransduktion in den AAS-Pflanzen auf die Expression der primären Cytokininantwortgene *ARR4* und *ARR6* (Brenner *et al.*, 2005) auswirken, wurde die Transkriptmenge der beiden Typ-A-Responseregulatorgene in Sprossmaterial elf Tage alter Keimlinge mittels quantitativer *Real-time*-PCR bestimmt. Die beiden Gene eignen sich als gute Indikatoren für

einen veränderten Cytokininstatus, da sie eine robuste Hochregulierung durch Cytokinin erfahren, was durch Metaanalysen verschiedener Microarray-Experimente und RNAseq-Analysen gezeigt wurde (Brenner *et al.*, 2012; Bhargava *et al.*, 2013). *ARR4* und *ARR6* sind in den AL-Linien stärker exprimiert als in der Wildtypkontrolle, in Linie #22 sogar um bis zu 0,92 (Abb. 12). In den AAS-Linien zeigt nur *ARR4* eine deutliche Transkriptabnahme, *ARR6* befindet sich nahezu auf Wildtypniveau (Abb. 12). Auch in den AC-Linien ist eine Reduktion der *ARR4*- und *ARR6*-Expression messbar, in Linie #32 sogar auf bis zu 0,3 im Vergleich zum Kontrollwert (Abb. 12).

3.1.4. Charakterisierung der *pATML1*-Linien

3.1.4.1. Die Expressionen von *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* haben ähnliche Auswirkungen auf das Wurzelwachstum

Der *ATML1*-Promotor ist nicht Spross-spezifisch, auch eine Aktivität in der Wurzel ist dokumentiert (Sessions *et al.*, 1999; Takada & Jürgens, 2007). Wie beim Proembryo findet im Verlauf der Embryonalentwicklung eine Begrenzung der Promotoraktivität auf die äußere Zellschicht des Suspensors statt und ist bis zum reifen Embryo nur dort nachweisbar (Takada & Jürgens, 2007). Nach der Samenkeimung ist *ATML1* in der Primärwurzel nur in der Epidermis der Wurzelhaube und im Bereich des Meristems exprimiert (Abb. 13A) (Sessions *et al.*, 1999) sowie in der Epidermis auswachsender Seitenwurzeln, wobei auch hier die Expression in der Spitze dominiert (Abb. 13B) (Sessions *et al.*, 1999).

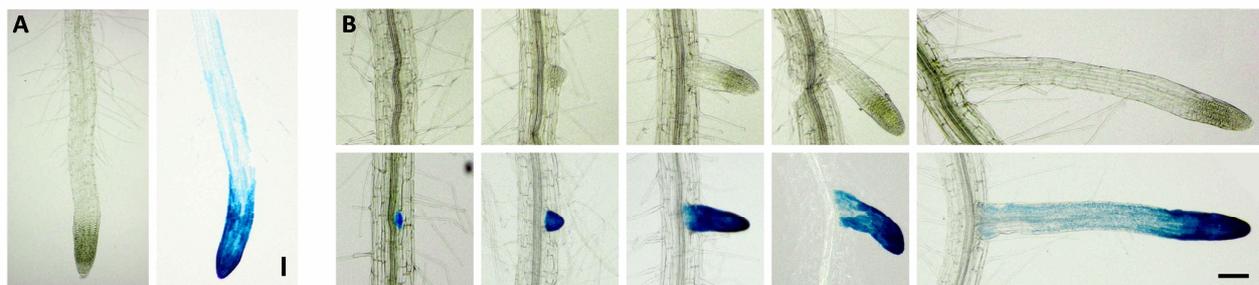


Abb. 13: Promotoraktivität von *pATML1* in der Wurzel. (A) Primärwurzelspitze von Col-0 (links) und *pATML1:GFP-GUS* (rechts) nach 12 h GUS-Färbung (Maßstab = 1 mm). (B) Verschiedene Stadien auswachsender Lateralwurzeln von Col-0 (oben) und *pATML1:GFP-GUS* (unten) nach 12 h GUS-Färbung (Maßstab = 100 µm). Es wurden zwölf Tage alte Keimlinge verwendet. Es wurden drei unabhängige Linien sowie jeweils mindestens zehn Pflanzen analysiert.

Da der *ATML1*-Promotor also auch in frühen Stadien der Wurzelorganbildung aktiv ist und außerdem ein Transport von Cytokininmetaboliten aus dem Spross ins Wurzelgewebe denkbar ist (Hirose *et al.*, 2008; Bishopp *et al.*, 2011b), wurden die Auswirkungen des veränderten Cytokininstatus in den AL- und AC-Linien auf die Morphologie der Wurzeln untersucht. Dazu wurden verschiedene Wachstumsparameter (Elongation der Primärwurzel, Anzahl und Dichte der Lateralwurzeln) erhoben. Zudem wurde der

Einfluss verschiedener Cytokininkonzentrationen im Anzuchtmedium auf das Wurzelwachstum untersucht, um zu prüfen, ob die Cytokininsensitivität verändert ist. Exogene Applikation von Cytokinin hemmt das Längenwachstum der Primärwurzel und die Ausbildung von Seitenwurzeln (Cary *et al.*, 1995; Laplaze *et al.*, 2007). Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Tanja Rublack durchgeführt. Als Kontrollen wurden neben Wildtyp- auch *LOG4*- und *CKX1*-Überexpressionspflanzen genutzt, um die Auswirkungen der begrenzten Veränderung des Cytokininstatus in der Wurzel der AL- und AC-Linien mit den Effekten einer ubiquitären Expression vergleichen zu können.

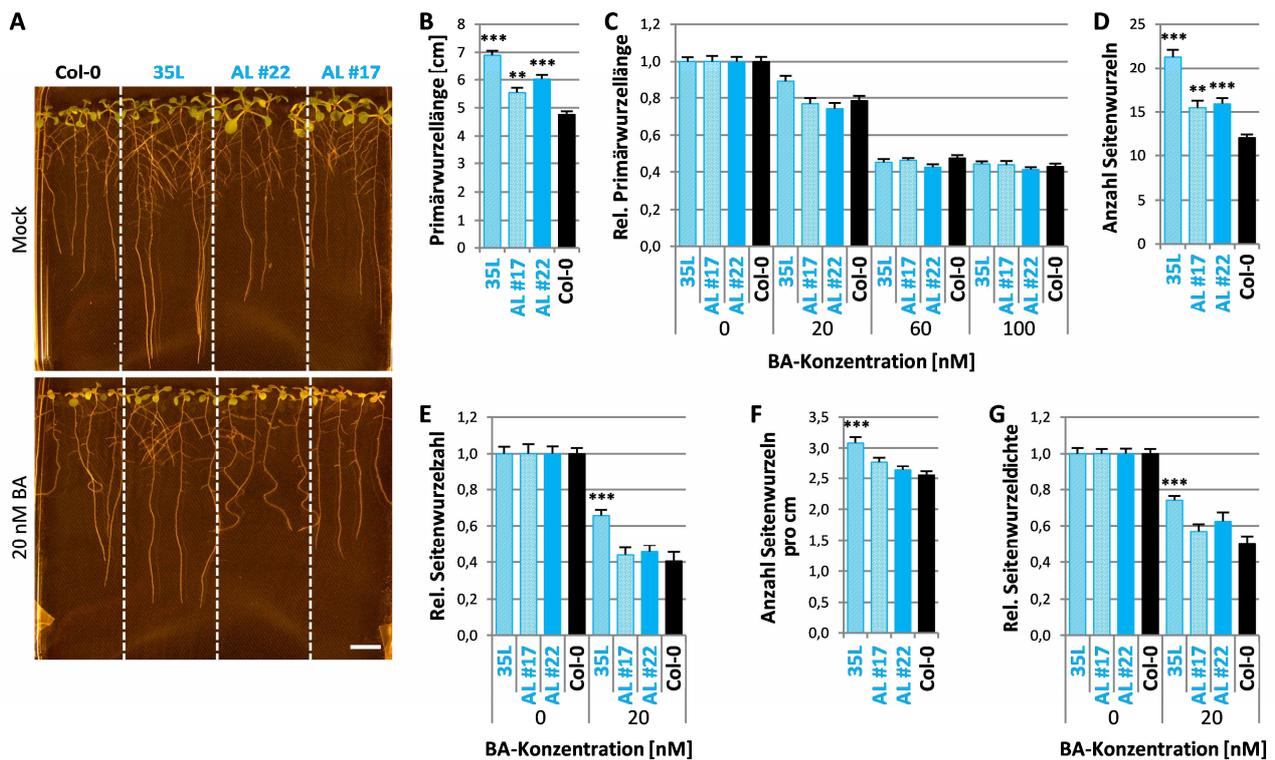


Abb. 14: AL-Pflanzen bilden längere Primärwurzeln und eine höhere Zahl an Seitenwurzeln bei gleicher Dichte. (A) Wurzelphänotyp zehn Tage alter 35L- und AL-*Arabidopsis*-Keimlinge auf Cytokinin-freiem (Mock) und Cytokinin-haltigem (20 nM BA) Medium im Vergleich zum Wildtyp. **(B)** Länge der Primärwurzel. **(C)** Anzahl der Seitenwurzeln. **(D)** Seitenwurzel-dichte (Anzahl der Seitenwurzeln pro cm Primärwurzel).

Es wurden zehn Tage alte Keimlinge analysiert, die auf ½ MS-Medium mit 1 % Saccharose unter LD-Bedingungen angezogen wurden; Fotos: Tanja Rublack. **(B, D, F)** Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 15-24); ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test). **(C, E, G)** Angegeben sind relative Mittelwerte mit Standardfehler (n = 13-24); *** = p < 0,001 (zweifaktorielle ANOVA, Tukey-Test). BA = Benzyladenin.

LOG-Überexpressionspflanzen produzieren aufgrund abnormaler Zellproliferation der Lateralwurzel-primordien weniger Seitenwurzeln, während die Länge der Primärwurzel zwischen p35S:*LOG*- und Wildtyp-Pflanzen sehr ähnlich ist (Kuroha *et al.*, 2009). Die hier durchgeführten Experimente zeigen jedoch, dass die mitgeführte p35S:*LOG4*-Linie 45 % längere Wurzeln als der Wildtyp ausbildet (Abb. 14A und Abb. 14B), ein typisches Phänomen bei cytokinindefizienten Pflanzen. Auch die beiden AL-Linien bilden längere Primärwurzeln, wobei der Effekt in Linie #22 erneut etwas stärker ist als in Linie #17

(26 % gegenüber 16 % längere Hauptwurzeln im Vergleich zum Wildtyp; Abb. 14A und Abb. 14B). Die prozentuale Verkürzung der Primärwurzel mit zunehmender Cytokininkonzentration ist in allen Linien ähnlich (Abb. 14C), was auf eine unveränderte Sensitivität gegenüber exogener Cytokininbehandlung schließen lässt. Außerdem produzieren alle transgenen Linien mehr Lateralwurzeln als die Wildtypkontrolle (Abb. 14D), allerdings reagieren nur 35L-Pflanzen schwächer auf das exogen applizierte Cytokinin (Abb. 14E). Nur bei 35L kann außerdem eine Verringerung des Abstands der Seitenwurzeln zueinander (Abb. 14F) sowie eine verminderte Cytokininsensitivität dieses Parameters (Abb. 14G) beobachtet werden.

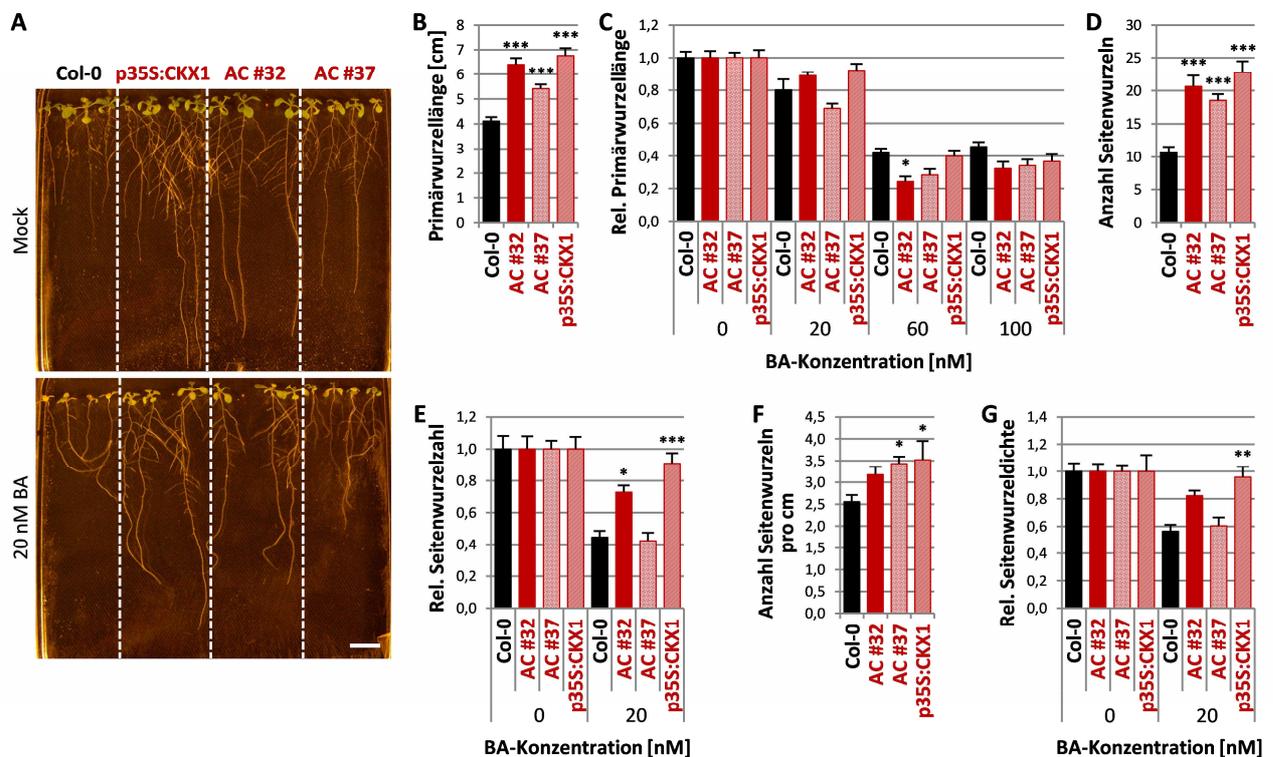


Abb. 15: AC-Pflanzen bilden längere Primärwurzeln und eine höhere Zahl an Seitenwurzeln bei verringertem Abstand und sind bei der Seitenwurzelbildung weniger sensitiv gegenüber exogen appliziertem Cytokinin. (A) Wurzelphänotyp zehn Tage alter p35S:CKX1- und AC-*Arabidopsis*-Keimlinge auf Cytokinin-freiem (Mock) und Cytokinin-haltigem (20 nM BA) Medium im Vergleich zum Wildtyp. (B) Länge der Primärwurzel. (C) Anzahl der Seitenwurzeln. (D) Seitenwurzelichte (Anzahl der Seitenwurzeln pro cm Primärwurzel).

Es wurden zehn Tage alte Keimlinge analysiert, die auf ½ MS-Medium mit 1 % Saccharose unter LD-Bedingungen angezogen wurden; Fotos: Tanja Rublack. (B, D, F) Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 15-20); * = p < 0,05, *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test). (C, E, G) Angegeben sind relative Mittelwerte mit Standardfehler (n = 13-24); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (zweifaktorielle ANOVA, Tukey-Test). BA = Benzyladenin.

Die AC- und p35S:CKX1-Pflanzen zeigen ebenfalls ein deutlich verstärktes Längenwachstum der Primärwurzeln (Abb. 15A und Abb. 15B) sowie eine erhöhte Anzahl an Seitenwurzeln (Abb. 15D), verbunden mit einem verringerten Seitenwurzelabstand (Abb. 15F). Die drei transgenen Linien zeigen hinsichtlich der Wurzelelongation im Vergleich zum Wildtyp keine eindeutige Reaktion auf die verschiedenen

applizierten Cytokininkonzentrationen (Abb. 15C), bei der Bildung und Dichte der Seitenwurzeln zeigen die AC-Linie #32 und p35S:CKX1 jedoch eine deutliche Reduktion der Cytokininsensitivität, während die AC-Linie #37 ähnlich wie der Wildtyp reagiert (Abb. 15E und Abb. 15G).

3.1.3.2. Die *pATML1*-Linien zeigen cytokininabhängige Veränderungen des Sprosswachstums und der Sprossentwicklung

Die Expression von *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* verursacht sichtbare pleiotrope Veränderungen in Pflanzenwachstum und -entwicklung. Neben Veränderungen des Blühverhaltens ist vor allem die positive Korrelation zwischen Cytokininstatus und Blattgröße erkennbar (Abb. 8A). Bereits kurz nach der Samenkeimung waren Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Aus diesem Grund wurden longitudinale Schnitte des vegetativen Sprossapikalmeristems angefertigt und untersucht. Beide AL-Linien haben ein vergrößertes vegetatives SAM, während das Meristem der AC-Linien kleiner ist (Abb. 16A). Interessanterweise können keine entsprechenden deutlichen Größenunterschiede beim Infloreszenzmeristem festgestellt werden (Abb. 16B), obwohl *pATML1* auch in der L1-Schicht von Infloreszenz- und Blütenmeristemen und im Protoderm bzw. in der Epidermis junger Blütenorgane aktiv ist (Lu *et al.*, 1996; Sessions *et al.*, 1999).

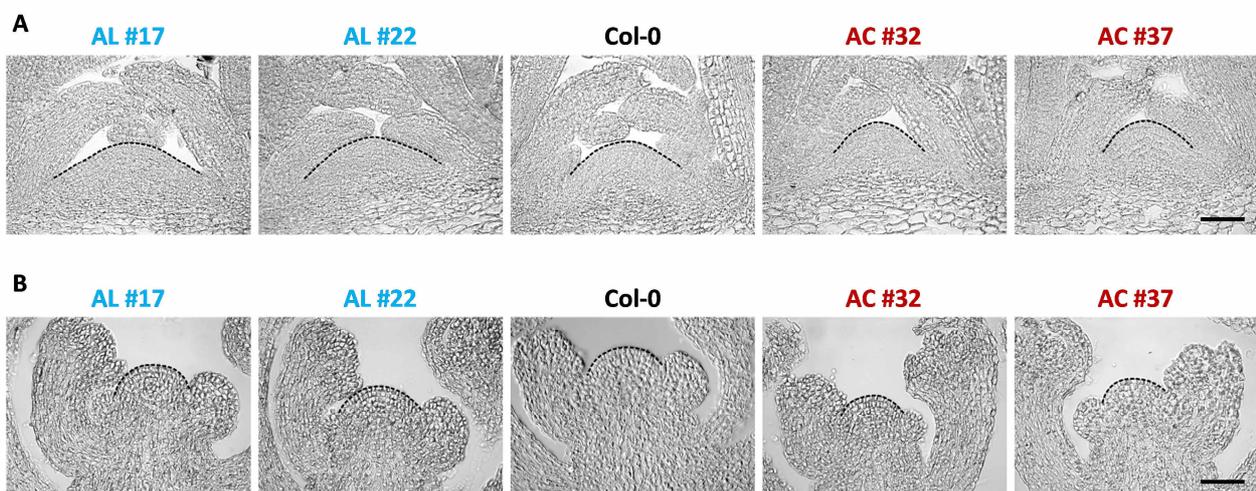


Abb. 16: Die Transgenexpression in *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* wirkt sich auf die Größe des Sprossapikalmeristems aus. Mittlere longitudinale Schnitte von (A) vegetativen Meristemen und (B) Infloreszenzmeristemen von *pATML1:LOG4*, Col-0 und *pATML1:CKX1-4xMyc*; Maßstab = 100 μ m.

Die für die Analyse verwendeten Pflanzen wurden (A) 30 Tage unter SD-Bedingungen bzw. (B) 25-38 Tage unter LD-Bedingungen angezogen; bei der Ernte der Infloreszenzen wurde darauf geachtet, dass die Stengel eine ähnliche Höhe (ca. 5-10 cm) aufwiesen.

Um herauszufinden, ob und wie sich die veränderte Morphologie auf die Aktivität des vegetativen Meristems auswirkt, wurde der Plastochronindex, also die Anzahl der Tage, die eine Pflanze für die

Bildung eines Blattes benötigt, bestimmt. Unter Langtagbedingungen weist in mehreren unabhängigen Experimenten keine der *pATML1*-Linien eine veränderte Blattbildungsrate auf (Abb. 17A). Unter Kurztagbedingungen hingegen zeigt AC #32 eine deutlich verzögerte Bildung neuer Rosettenblätter, während sich der Plastochronindex von AL- und AAS-Pflanzen nicht vom Wildtyp unterscheidet (Abb. 17B).

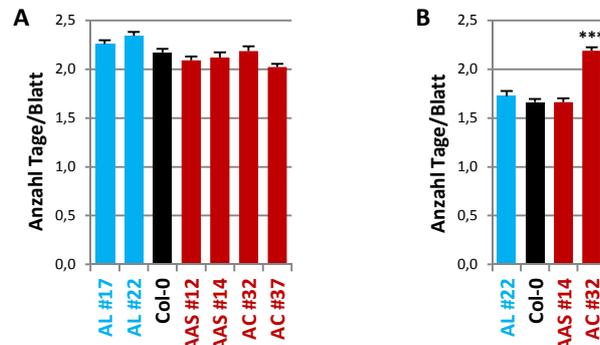


Abb. 17: Plastochronindex der AL-, AAS- und AC-Linien im Vergleich zum Wildtyp. Blattbildungsrate unter (A) LD-Bedingungen bzw. (B) SD-Bedingungen. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) n = 27-28; (B) n = 17-20); *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

Während also nur bedingt Änderungen in der Blattbildungsrate beobachtet werden können, zeigt das Rosettenwachstum der *pATML1*-Linien sehr deutliche cytokininabhängige Veränderungen (Abb. 18). Die Expression von *pATML1:LOG4* führt zu einer Vergrößerung der Rosette, während der verringerte Cytokininstatus in AAS- und AC-Linien in einer kleineren Rosette resultiert (Abb. 18A). Der Effekt der *pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc*-Expression auf den Rosettendurchmesser fiel in verschiedenen Experimenten unterschiedlich stark aus, sodass die Rosette teilweise ähnlich groß war wie die des Wildtyps, wobei aber stets eine Tendenz zu einer kleineren Rosette sichtbar war.

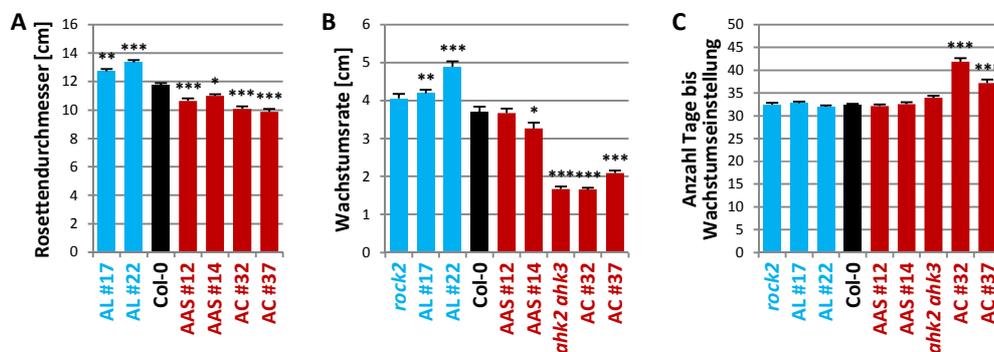


Abb. 18: Rosettenwachstum der pATML1-Linien. (A) Rosettendurchmesser von AL, AAS und AC im Vergleich zum Wildtyp (Col-0). (B) Wachstumsrate der Rosette und (C) Anzahl der Tage bis zur Einstellung des Rosettenwachstums bei *rock2*, AL, Col-0, AAS, *ahk2 ahk3* und AC. Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen; angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) n = 18-24; (B, C) n = 22-27); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

Die *Gain-of-function*-Mutante *rock2* und die Doppelrezeptormutante *ahk2 ahk3* bilden ebenfalls größere bzw. kleinere Rosetten aus (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006; Jensen, 2013) und wurden in die weiteren Experimente einbezogen. AL, *rock2*, Col-0, AAS, AC und *ahk2 ahk3* wurden unter Langtagbedingungen angezogen und alle zwei bis drei Tage wurde der Rosettendurchmesser bestimmt. Die größere Rosette von Pflanzen mit erhöhtem Cytokininstatus ist das Ergebnis einer höheren Wachstumsrate (Abb. 18B), wobei sie genauso lange wachsen wie Wildtyp-Pflanzen (Abb. 18C). Pflanzen mit einem reduzierten Cytokininstatus wachsen hingegen langsamer (Abb. 18B). Während AAS-Pflanzen und die *ahk2 ahk3*-Doppelrezeptormutante das Rosettenwachstum etwa zeitgleich mit dem Wildtyp einstellen, wachsen AC-Pflanzen interessanterweise bis zu 9,5 Tage länger (Abb. 18C).

Die AL-Linien bilden größere Rosettenblätter als der Wildtyp, die AC-Linien kleinere (Abb. 19A). Die Fläche des siebten Rosettenblattes der AL-Pflanzen ist 40-45 % größer als beim entsprechenden Blatt des Wildtyps (Abb. 19A und Abb. 19B). Die Blattgröße der AC-Linien erreicht hingegen nur 35-40 % des Wildtypwertes (Abb. 19A und Abb. 19B). Bei den AAS-Pflanzen ist die Blattfläche nur geringfügig verringert (Abb. 19A und Abb. 19B).

Um herauszufinden, ob dieser Befund durch unterschiedlich starke Zellproliferation oder -expansion zu erklären ist, wurden Zellzahl und Zellgröße der abaxialen Epidermis des siebten Rosettenblattes bestimmt. Die epidermale Zellgröße der AL-Linien ist mit der des Wildtyps vergleichbar (Abb. 19C und Abb. 19D), aufgrund der größeren Blattfläche sind aber insgesamt mehr Zellen vorhanden (Abb. 19E). Auch die Zellgröße der AAS-Blätter unterscheidet sich nicht vom Wildtyp (Abb. 19C und Abb. 19D). Da die Größe der Blattspreite kaum verändert ist, sind nur geringfügig weniger Zellen in der Blattepidermis vorhanden (Abb. 19E). Die Epidermiszellen der AC-Linien #32 und #37 sind um 60 % bzw. 32 % größer als bei Col-0 (Abb. 19C und Abb. 19D), was letztlich zur Folge hat, dass die Blattepidermis der AC-Linien nur ein Viertel der Zellen des Wildtyps enthält (Abb. 19E).

Der Stomataindex, d. h. der Anteil der Stomata an der Gesamtpopulation der epidermalen Zellen, kann darüber Aufschluss geben, ob die Differenzierung der Zellen durch den veränderten Cytokininstatus beeinflusst ist. Die durch die Cytokinindefizienz reduzierte Zellzahl in den AC-Linien wird jedoch nicht von einem veränderten Stomataindex begleitet (Abb. 19E).

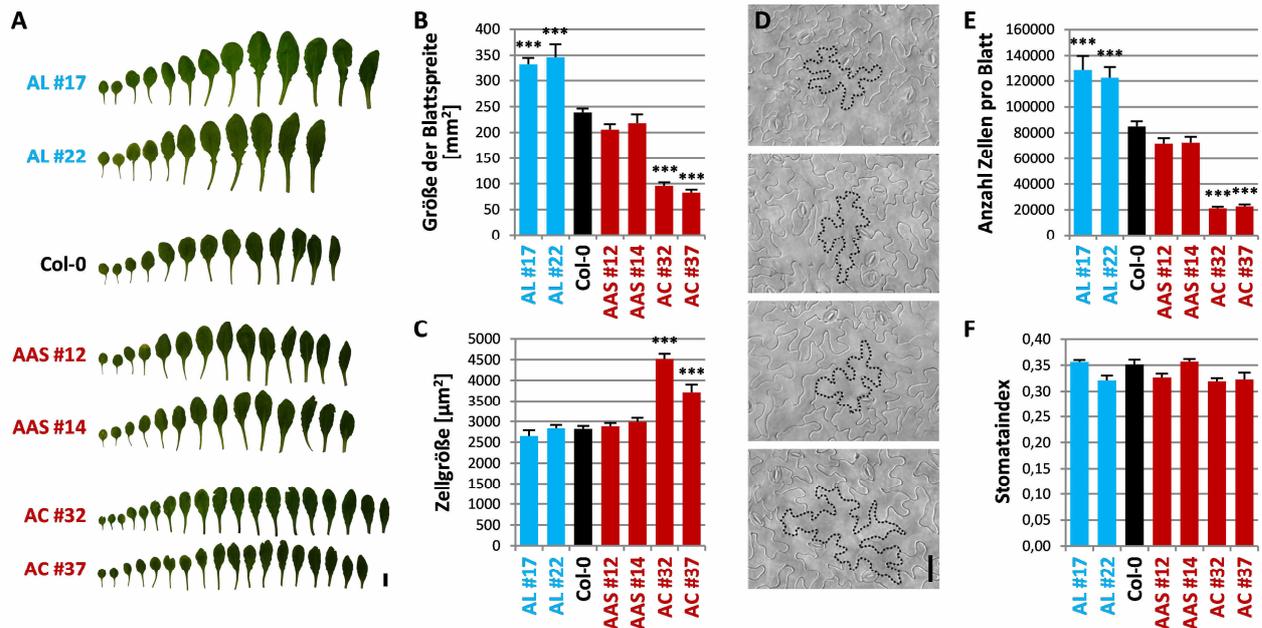


Abb. 19: Analyse der abaxialen Epidermis des siebten Rosettenblattes der *pATML1*-Linien. (A) Rosettenblätter von AL, AAS und AC im Vergleich zum Wildtyp (Col-0). **(B)** Größe der Blattspreite. **(C)** Zellgröße. **(D)** Ausschnitt der abaxialen Epidermis, die Umrisse von Beispielizehen sind mit gestrichelten Linien markiert; von oben nach unten: AL, Col-0, AAS, AC; Maßstab = 50 µm. **(E)** Zellzahl pro Blatt. **(F)** Stomataindex (Anteil der Stomata an der Gesamtpopulation der epidermalen Zellen) von AL, Col-0, AAS und AC.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. **(A)** Die abgebildeten Blätter stammen von Pflanzen, deren Infloreszenzstengel etwa 15 cm lang waren. **(B-F)** Die analysierten Blätter wurden 30 TNK geerntet, wobei darauf geachtet wurde, nur adulte Blätter zu verwenden, da sich die Identität des Blattes auf die Zellgröße auswirkt (Usami *et al.*, 2009). **(B, C, E, F)** Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 8$; *** = $p < 0,001$ (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test)).

Es wurden Querschnitte der Infloreszenzstengel 2-3 cm oberhalb der Rosette der *pATML1*-Linien mit Col-0, der AHK2-*gain-of-function*-Mutante *rock2* und der *ahk2 ahk3*-Doppelrezeptormutante verglichen (Abb. 20). Im Infloreszenzstengel ist zwar laut mRNA-*in-situ*-Daten keine *ATML1*-Genaktivität feststellbar (Lu *et al.*, 1996). Allerdings ist bekannt, dass Cytokininmetabolite vom Bildungsort in andere Teile der Pflanze transportiert werden (Hirose *et al.*, 2005; Kudo *et al.*, 2010; Bishopp *et al.*, 2011a; Ko *et al.*, 2014) und dass Cytokinin die Kambiumaktivität verstärkt (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008; Nieminen *et al.*, 2008). Es zeigt sich, dass alle Linien mit einem erhöhten Cytokininstatus dickere Stengel aufweisen, wobei der stärkste Effekt bei *rock2* sichtbar ist (Zunahme von 13 % im Vergleich zum Wildtyp). Der Stengeldurchmesser der beiden AAS-Linien unterscheidet sich nur minimal vom Wildtyp; *ahk2 ahk3* und die AC-Linien haben hingegen deutlich schmalere Stengel. Die stärkste Abnahme der Stengeldicke tritt bei AC #32 auf (32 % im Vergleich zu Col-0).

Die Stengel der AL-Pflanzen wachsen nicht nur stärker im Durchmesser, sondern auch in die Höhe, die AAS- und AC-Linien erreichen hingegen etwa die gleiche Höhe wie Wildtyp-Pflanzen (Abb. 21A). AC-Pflanzen verfügen über eine reduzierte Apikaldominanz, sie bilden mehr als doppelt so viele axilläre Triebe wie Col-0 (Abb. 21B). Die AL- und AAS-Linien zeigen wiederum keine signifikanten Unterschiede

zum Wildtyp, in den durchgeführten Experimenten wurden aber Tendenzen zu weniger bzw. mehr axillären Seitentrieben deutlich (Abb. 21B).

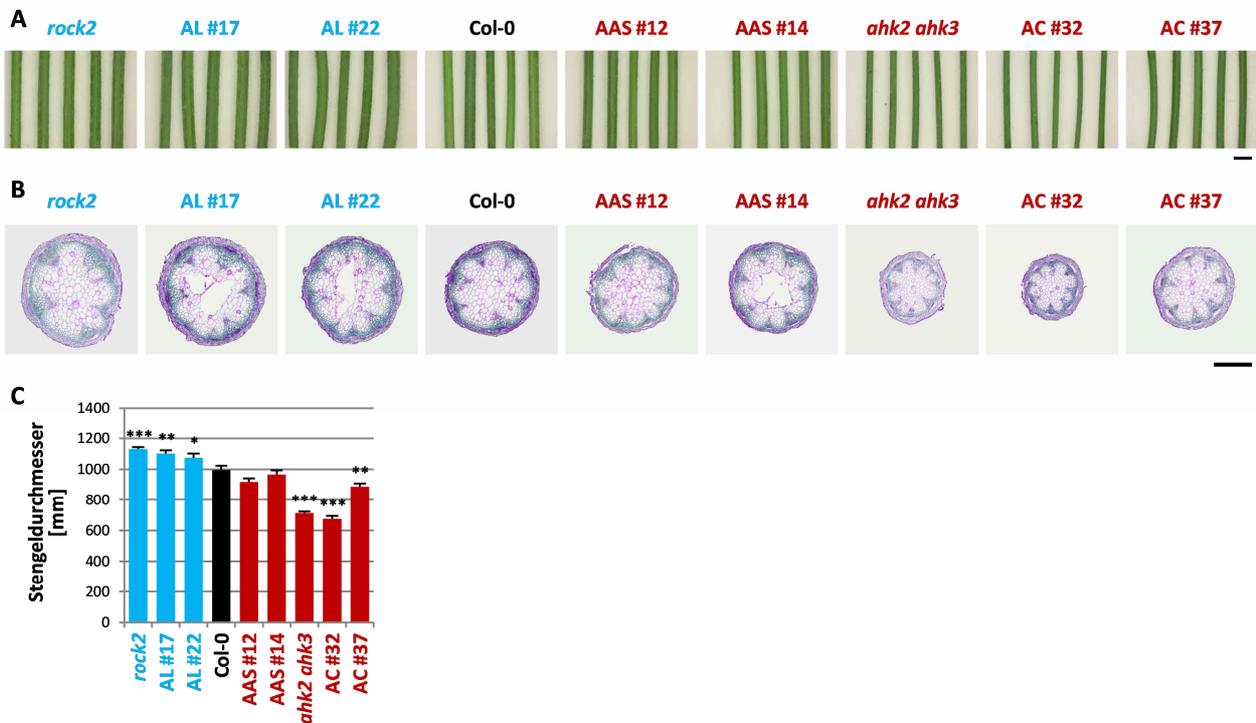


Abb. 20: Die Veränderung des Cytokininstatus in den *pATML1*-Linien beeinflusst die Dicke des Stengels. (A) Infloreszenzstengel (Maßstab = 20 mm), **(B)** mit Toluidinblau gefärbte Stengelquerschnitte (Maßstab = 500 µm) und **(C)** Stengeldurchmesser von *rock2*, AL, Col-0, AAS, *ahk2 ahk3* und AC.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Die analysierten Stengelstücke wurden 2-3 cm oberhalb der Rosette entnommen, wenn die Infloreszenzstengel 12-15 cm hoch waren. **(C)** Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 17-24); * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

Um herauszufinden, ob sich die Unterschiede in Wuchshöhe und Apikaldominanz auf den Samenertrag auswirken, wurde zunächst die Schotenproduktion quantifiziert. Bei allen getesteten *pATML1*-Linien zeigt die durchschnittliche Gesamtschotenanzahl pro Pflanze zwar keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 21E), allerdings generieren die AC-Linien am Haupttrieb weniger Schoten bei größerem Abstand, während *pATML1:LOG4*-exprimierende Pflanzen zwar eine ähnliche Zahl an Schoten bilden, aber aufgrund der Wuchshöhenzunahme längere Internodien aufweisen (Abb. 21C-E). Die Infloreszenzen der AL- und AAS-Linien lassen keine sichtbaren Unterschiede zu Wildtyp-Infloreszenzen erkennen, während die Infloreszenzen von *pATML1:CKX1-4xMyc*-exprimierenden Pflanzen weniger Knospen enthalten (Abb. 21F). Die trotzdem ähnliche Gesamtzahl an gebildeten Schoten bei AC-Pflanzen ist demnach in der hohen Zahl an axillären Seitentrieben begründet.

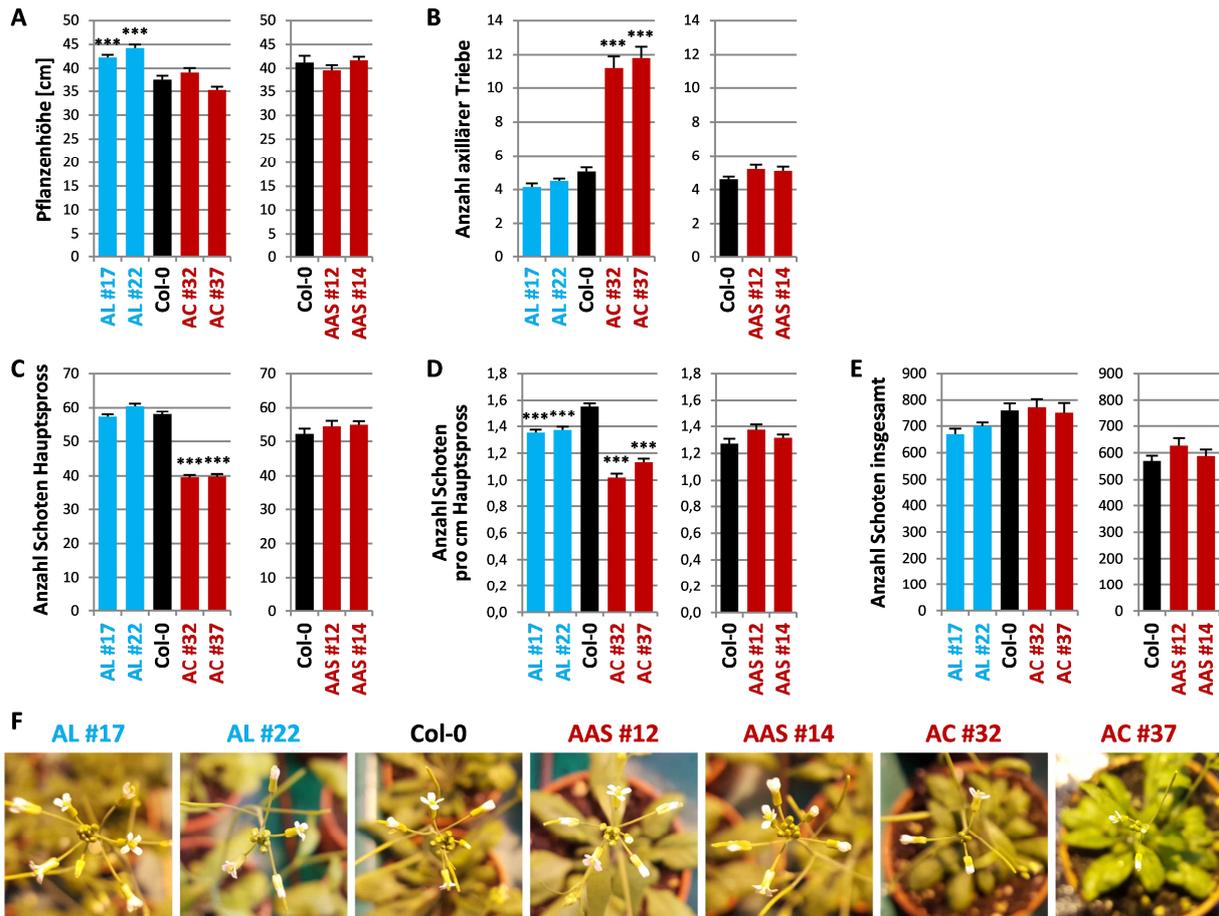


Abb. 21: Sprosswachstum in der reproduktiven Phase und Schotenproduktion. (A) Maximale Pflanzenhöhe, **(B)** Anzahl der axillären Triebe, **(C)** Anzahl der Schoten am Hauptspross, **(D)** Schotendichte am Hauptspross (Anzahl der Schoten pro cm), **(E)** Anzahl der Schoten insgesamt und **(F)** Infloreszenzen von je zwei unabhängigen Linien von AL, AAS und AC im Vergleich zum Wildtyp (Col-0).

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Aufgrund der verringerten Apikaldominanz in pATML1:CKX1-Pflanzen war die Identifizierung des Primärsprosses bei einigen Pflanzen nicht möglich, hier wurde der längste Stengel analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 18-20 (AL, AC) bzw. n = 10 (AAS)). *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

Obwohl sich die Gesamtschotenanzahl bei AL- und AC-Pflanzen nicht von der des Wildtyps unterscheidet, hat der veränderte Cytokininstatus dennoch Auswirkungen auf den Samenertrag. In AL-Pflanzen kann eine durchschnittliche Ertragszunahme von bis zu 19 % gemessen werden (Abb. 22A). Der Anstieg des Ertragsgewichts ist allerdings nicht in einer Größenzunahme der Samen begründet (Abb. 22B). AL-Pflanzen bilden längere Schoten (Abb. 22C und Abb. 22D). Dies resultiert möglicherweise aus einer größeren Anzahl an Samenanlagen, AL-Schoten enthalten durchschnittlich 9 % mehr Samen, die zudem dichter gepackt sind als in Wildtyp-Schoten (Abb. 22F und Abb. 22G).

Die Epidermis-spezifische Expression von *CKX1* führt zu einer Reduktion des Ertrags von bis zu 40 % (Abb. 22A) und zu größeren Samen (Abb. 22B). Obwohl der einzelne Samen also schwerer ist, kommt es zu einem Ertragsverlust. AC-Schoten enthalten verglichen zum Wildtyp kaum mehr als die Hälfte an

Samen (Abb. 22E und Abb. 22F) und sind kleiner (Abb. 22C). Die Vergrößerung der Samen sorgt zudem für eine geringere Samendichte (Abb. 22G).

Die Blüten und Gynoeceen der *pATML1*-Linien zeigen nicht so deutliche Größenunterschiede; einzig die Blühorgane der AC-Linien sind etwas kleiner als beim Wildtyp (Abb. 23).

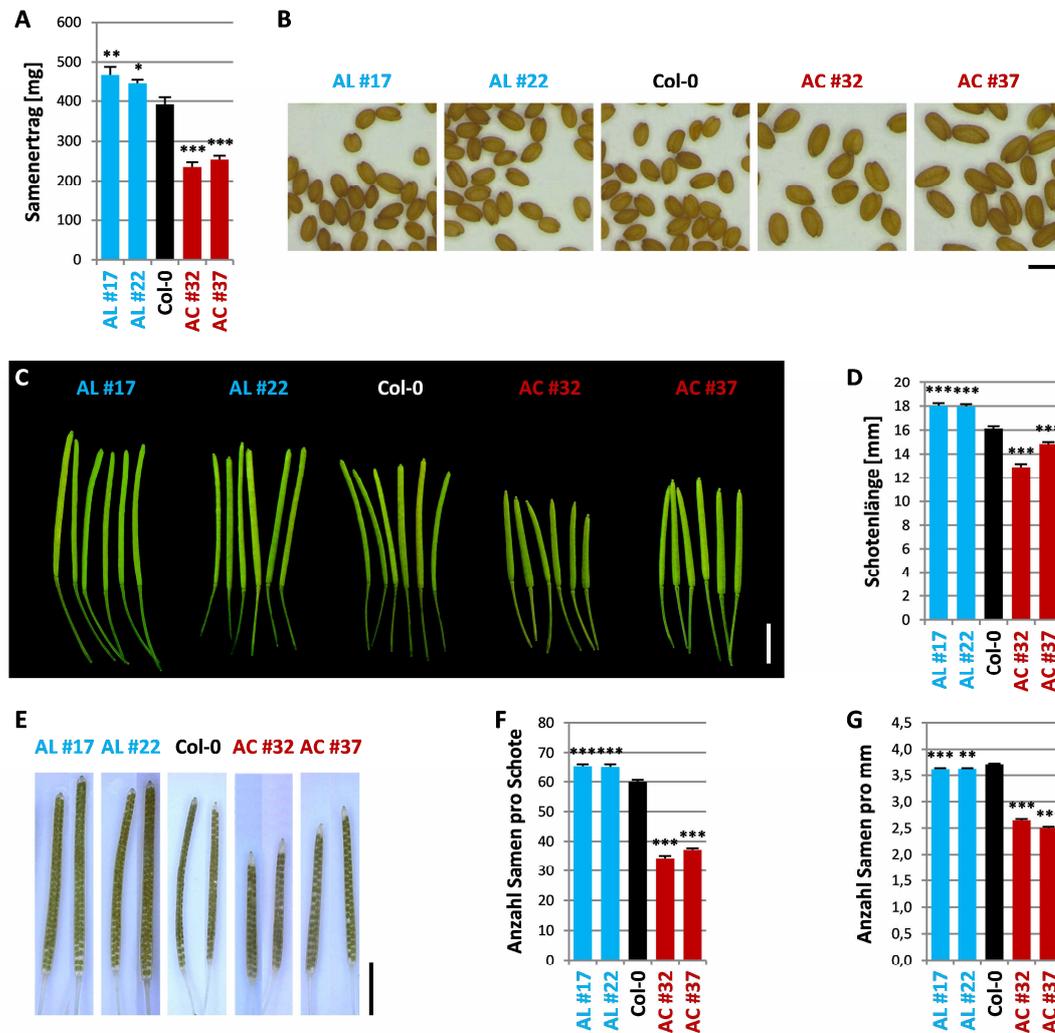


Abb. 22: Die Expression von *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* wirkt sich auf den Samenertrag aus. (A) Samenertrag pro Pflanze, (B) Samen (Maßstab = 500 µm), (C) ausgewachsene Schoten (Maßstab = 5 mm), (D) Schotenlänge, (E) geklärte Schoten (Maßstab = 5 mm), (F) Samenzahl pro Schote und (G) Samendichte (Anzahl Samen pro mm) bei AL, Wildtyp (Col-0) und AC.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. (A, D, F, G) Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) n = 24-26 bzw. (D, F, G) n = 18-30); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

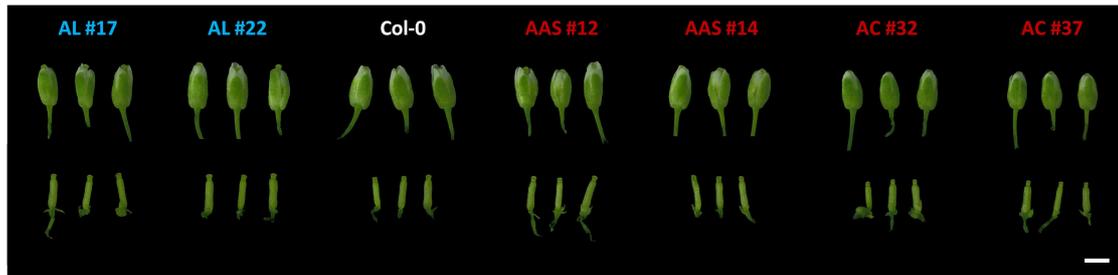


Abb. 23: Blüten und Gynoeceen der *pATML1*-Linien. Blüten (Stadium 13 nach Smyth *et al.* (1990)) und Gynoeceen von AL, AAS und AC im Vergleich zum Wildtyp; Maßstab = 1 mm. Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen.

3.1.5. Die Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 und der Typ-B-Responseregulator ARR1 vermitteln das verstärkte Rosettenwachstum bei *pATML1:LOG4*-Pflanzen

Um herauszufinden, welche Komponenten des Cytokinin-Signalwegs das verstärkte Rosettenwachstum bei *pATML1:LOG4*-Pflanzen vermitteln, wurde die AL-Linie #22 mit den Rezeptordoppelmutanten *cre1 ahk2*, *cre1 ahk3* und *ahk2 ahk3* sowie den drei Typ-B-ARR-Doppelmutanten *arr1 arr10*, *arr1 arr12* und *arr10 arr12* gekreuzt und dreifach homozygote Linien wurden selektiert.

Von den drei Doppelrezeptormutanten ist nur für *ahk2 ahk3* eine deutlich kleinere Rosette publiziert, *cre1 ahk2* und *cre1 ahk3* sind dem Wildtyp sehr ähnlich (Higuchi *et al.*, 2004), allerdings sind in einigen Publikationen auch bei *cre1 ahk3* Tendenzen zu einer kleineren Rosette erkennbar, z. B. in Riefler *et al.* (2006) und in Kiba *et al.* (2013). Unter den verwendeten Wachstumsbedingungen hatten *cre1 ahk3*-Pflanzen stets eine signifikant kleinere Rosette (Abb. 24). Die Expression des *pATML1:LOG4*-Transgens im *cre1 ahk3*-Hintergrund führt zu einer messbaren Zunahme des Rosettendurchmessers (Abb. 24B). Auch in Kombination mit der Doppelmutante *cre1 ahk2* entstehen Pflanzen mit einer größeren Rosette (Abb. 24). Nur im Hintergrund von *ahk2 ahk3* kann kein verstärktes Rosettenwachstum festgestellt werden (Abb. 24). Daraus lässt sich zum einen schlussfolgern, dass CRE1/AHK4 keinen erkennbaren Einfluss auf das Blattwachstum hat. Zum anderen kann der Funktionsverlust der Rezeptorgene *AHK2* und *AHK3* nur in Kombination das verstärkte Blattwachstum verhindern. Demnach sind *AHK2* und *AHK3* die vermittelnden Rezeptoren in diesem Prozess.

Von den drei verwendeten Typ-B-ARR-Doppelmutanten ist nur bei *arr1 arr12* ein reduziertes Sprosswachstum festzustellen, *arr1 arr10* und *arr10 arr12* unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Rosettengröße nicht von Col-0 (Abb. 25). Während die Expression des *pATML1:LOG4*-Transgens im Hintergrund von *arr10 arr12* ein verstärktes Rosettenwachstum hervorruft, konnte weder bei *arr1 arr10* AL noch bei *arr1 arr12* AL im Vergleich zur jeweiligen Doppelmutantenlinie eine Zunahme des Rosettendurchmessers beobachtet werden (Abb. 25). Weder der einzelne Funktionsverlust von *ARR10* oder *ARR12* noch der gleichzeitige Ausfall beider Gene ist in der Lage die Auswirkungen des Transgens auf das

Rosettenwachstum zu blockieren. Der *ARR1-Knockout* unterbindet hingegen als Teil jeder untersuchten Doppelmutation eine Größenzunahme der Rosette durch *pATML1:LOG4* (Abb. 25). Ob eine *arr1*-Einzelmutante ebenfalls dazu in der Lage wäre, lässt sich aus diesem Experiment leider nicht ableiten. Fest steht jedoch, dass der funktionelle Verlust von *ARR1* nur zusammen mit einem gleichzeitigen Wegfall der *ARR12*-Funktion eine verkleinerte Rosette verursachen kann (Abb. 25). *ARR12* könnte also eine unterstützende Funktion bei der Vermittlung des Cytokininsignals in diesem Prozess zukommen.

3.1.6. Die Rolle der Epidermis bei der cytokininvermittelten Determination der Blattgröße

Die Epidermis hat eine wichtige Funktion bei der Regulation der Organgröße und -form (Savaldi-Goldstein & Chory, 2008; Czesnick & Lenhard, 2015). Die Zellteilungsrate der Epidermis kann die Zellproliferation und -expansion in subepidermalen Geweben beeinflussen (Savaldi-Goldstein *et al.*, 2007; Marcotrigiano, 2010). Aufgrund ihrer Mobilität sind Phytohormone offensichtliche Kandidaten für die Koordination des Wachstums unterschiedlicher Gewebe und damit für die Determination der Organgröße. Cytokinine könnten als autonomes oder nicht-autonomes Signal die Zellproliferation in der Epidermis fördern und damit das Organwachstum regulieren. Voraussetzung dafür wäre das Vorhandensein von Rezeptoren und anderen Komponenten der Cytokininsignaltransduktion in der äußeren Zellschicht. Da über die genaue gewebsspezifische Lokalisation der Cytokininrezeptoren nicht sehr viel bekannt ist, wurden Lokalisationsstudien mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung und Immunohistochemie durchgeführt, die leider erfolglos blieben. Auch der Versuch einer Komplementation der *ahk2 ahk3*-Doppelmutante mit *pATML1:AHK2* und *pATML1:AHK3* verlief ergebnislos. Weder durch Kreuzung noch durch die Transformation der Epidermis-spezifischen *AHK*-Konstrukte in die Rezeptordoppelmutante konnten dreifach homozygote Individuen selektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Da das reduzierte Rosettenwachstum der AAS-Pflanzen einen lokalen, wenn auch schwachen, Einfluss des Cytokininsignalwegs in der Epidermis auf das Blattwachstum nahelegte, wurde versucht einen indirekten Nachweis zu erbringen. Dazu wurden durch Kreuzen von AL #22 und AAS #12 doppelt transgene Pflanzen generiert und analysiert. Während AL #22 und AAS #12 eine gewohnt größere bzw. kleinere Rosette bilden, erreicht der Durchmesser der AL AAS-Rosette kaum den Wildtypwert (Abb. 26). Die Expression der beiden Transgene in AL AAS wurde nicht überprüft, allerdings zeigt der Vergleich mit der Analyse der Juvenil-adult-Transition in diesen Pflanzen (Abb. 29C), dass beide Transgene aktiv sind.

Es ist nicht geklärt, ob das *pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc*-Transgen die Cytokininsignalkaskade in der Epidermis in Gänze unterbindet oder ob eine Restaktivität verbleibt. Das Experiment zeigt aber, dass es den Effekt der *pATML1:LOG4*-Expression auf das Blattwachstum unterbinden kann (Abb. 26). Demnach könnte dem epidermalen Cytokininstatus eine wichtige Rolle bei der Regulation des Rosettenwachstums zukommen.

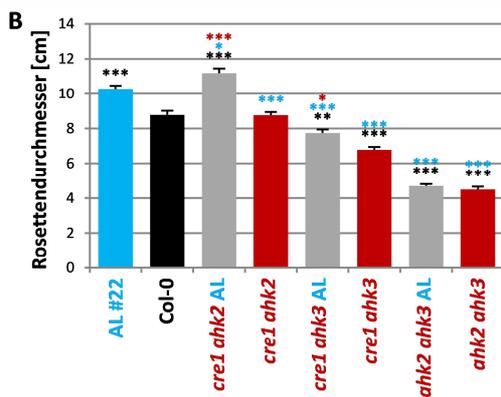
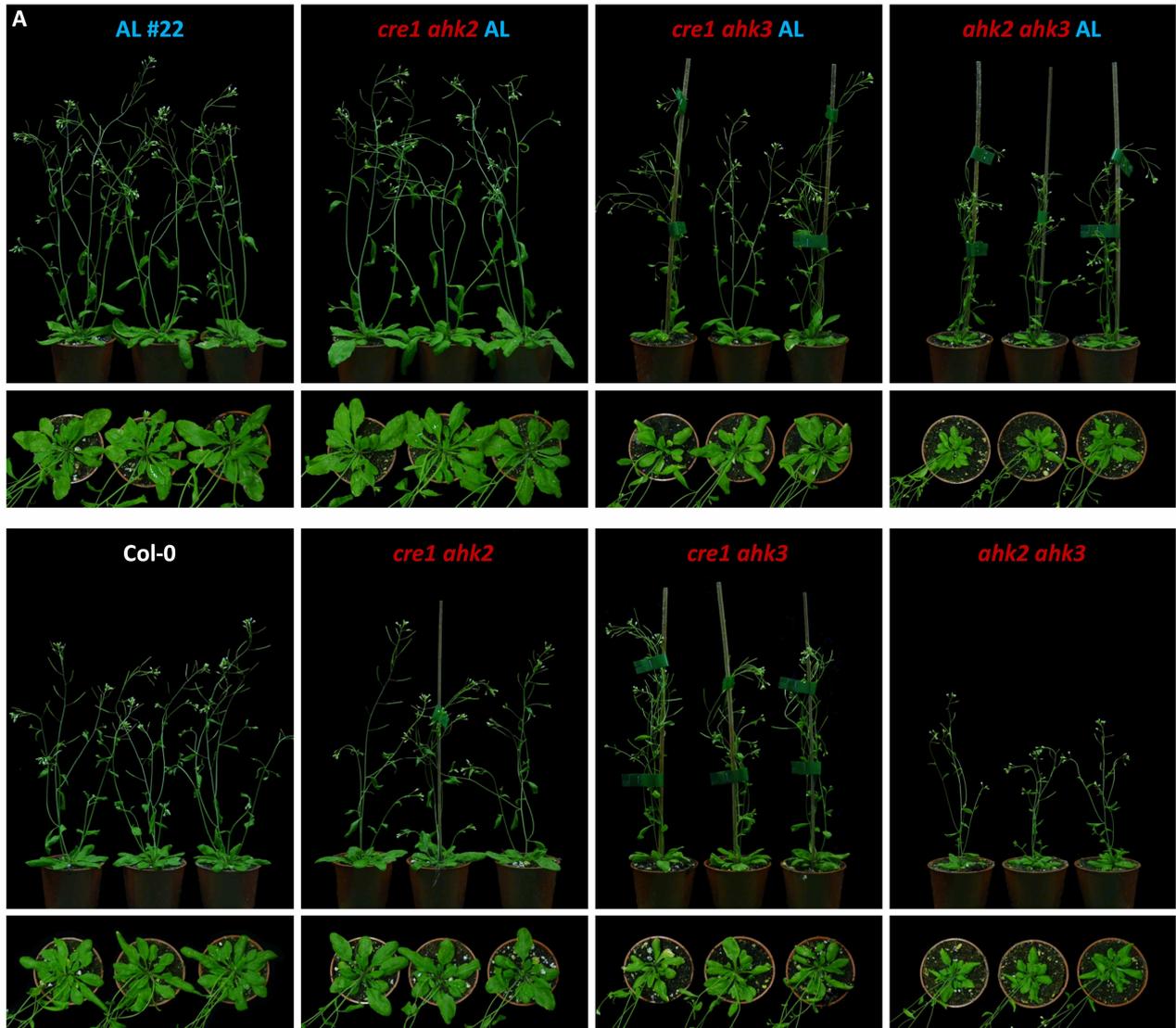


Abb. 24: Die Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 vermitteln das verstärkte Rosettenwachstum bei pATML1:LOG4-Pflanzen. **(A)** Phänotypen der Linien *cre1 ahk2*/pATML1:LOG4, *cre1 ahk3*/pATML1:LOG4 und *ahk2 ahk3*/pATML1:LOG4 im Vergleich zu Wildtyp, pATML1:LOG4 und den Doppelmutanten *cre1 ahk2*, *cre1 ahk3* und *ahk2 ahk3* (33 TNK). **(B)** Rosettendurchmesser (33 TNK).

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. **(B)** Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 28); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, bezogen auf Wildtyp (schwarz), AL #22 (blau) und der entsprechenden ARR-Doppelmutante (rot) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

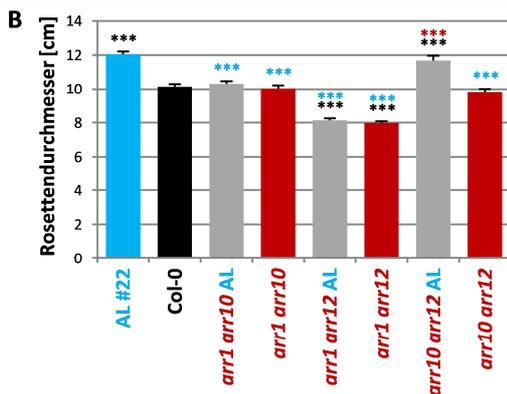
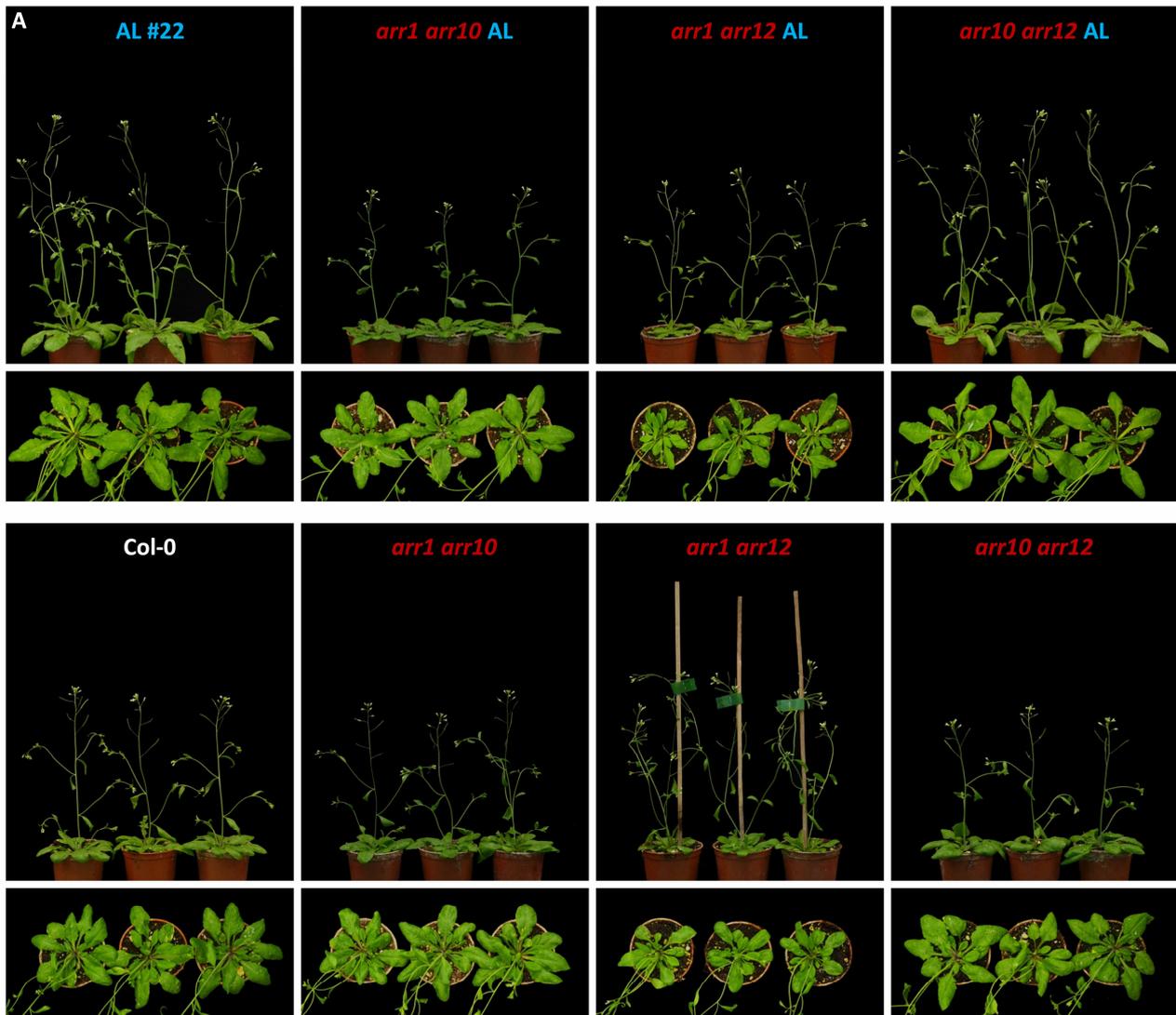


Abb. 25: Der Typ-B-Responseregulator ARR1 ist an der Vermittlung des verstärkten Rosettenwachstums bei pATML1:LOG4-Pflanzen beteiligt. **(A)** Phänotypen der Linien *arr1 arr10/pATML1:LOG4*, *arr1 arr12/pATML1:LOG4* und *arr10 arr12/pATML1:LOG4* im Vergleich zu Wildtyp, pATML1:LOG4 und den Doppelmutanten *cre1 ahk2*, *cre1 ahk3* und *ahk2 ahk3* (29 TNK). **(B)** Rosettendurchmesser (28 TNK).

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. **(B)** Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 27-28); *** = p < 0,001, bezogen auf Wildtyp (schwarz), AL #22 (blau) und der entsprechenden ARR-Doppelmutante (rot) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

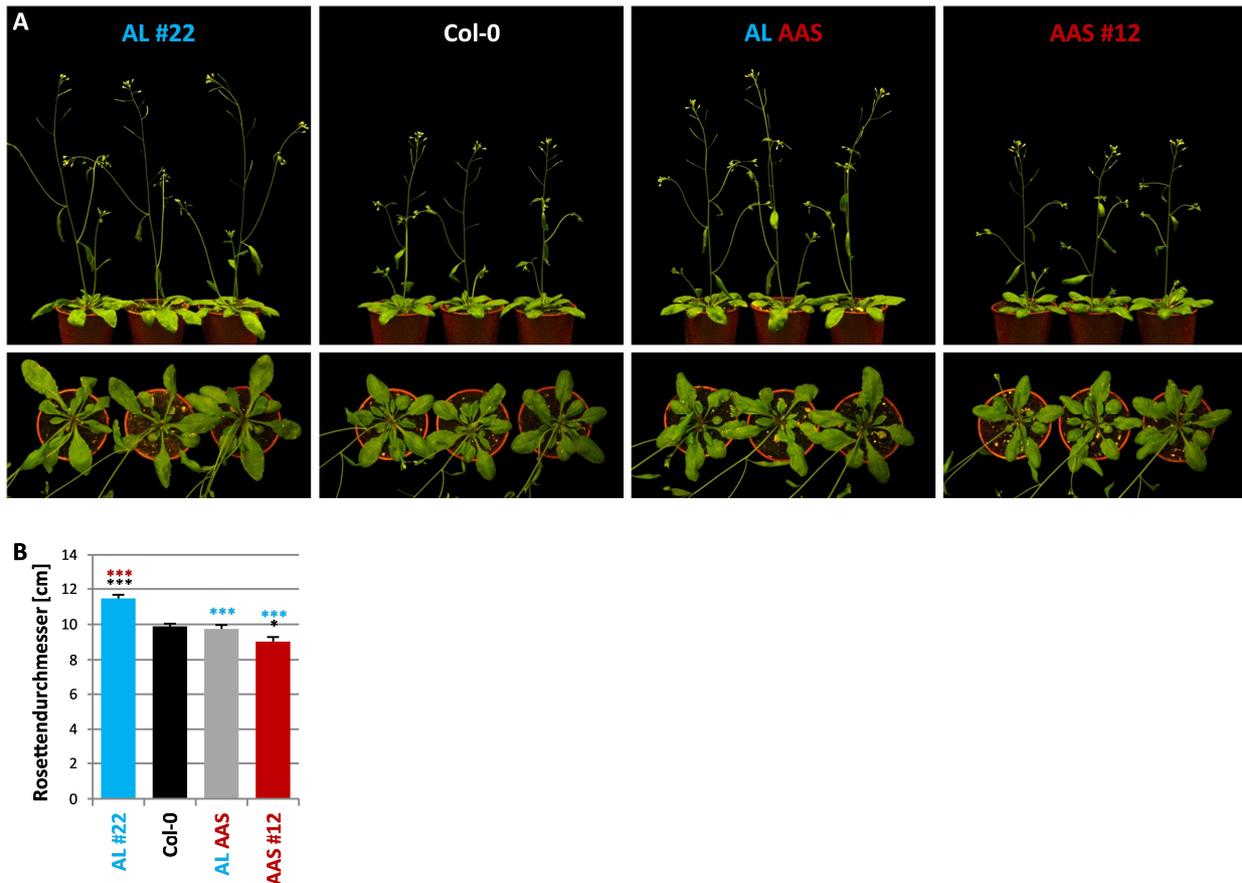


Abb. 26: Doppelt transgene AL AAS-Pflanzen machen eine Cytokinin- und Epidermis-abhängige Regulation des Rosettenwachstums deutlich. (A) Phänotyp doppelt homozygoter AL AAS-Pflanzen im Vergleich zu AL, Col-0 und AAS (26 TNK). **(B)** Rosettendurchmesser (28 TNK).

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. **(B)** Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 21-24); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, bezogen auf Wildtyp (schwarz), AL #22 (blau) und AAS #12 (rot) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

Nobusawa *et al.* (2013) verknüpften die cytokininabhängige Regulation der Blattgröße mit in der Epidermis gebildeten sehr langkettigen Fettsäuren (*Very-long-chain fatty acids*, VLCFAs). Diese sind an der Bildung von kutikulärem Wachs beteiligt. Wildtyp-Pflanzen, die mit dem VLCFA-Inhibitor Cafenstrol behandelt werden, sowie die VLCFA-Synthesemutante *pasticcino* zeigen eine verstärkte Zellproliferation in der Vaskulatur, die auf einen erhöhten Cytokininspiegel zurückzuführen ist. Dies resultiert in größeren Blättern, wohingegen die Cytokininsynthesemutante *ipt3 ipt5 ipt7* keine Cafenstrol-induzierte Wachstumszunahme der Rosette zeigte. Nach Experimenten mit transgenen Pflanzen, die *CKX1* Epidermis- bzw. Vaskulatur-spezifisch exprimieren, stellten die Autoren die Hypothese auf, dass die VLCFA-Produktion in der Epidermis die Cytokininsynthese in der Vaskulatur supprimieren und auf diese Weise die Zellteilungsaktivität in den inneren Geweben beeinflussen könnte, was letztendlich Auswirkungen auf das Sprosswachstum haben könnte.

Die von den Autoren genutzte Linie *pATML1:CKX1-Venus* zeigte nach Cafenstrol-Behandlung eine dem Wildtyp ähnliche Vergrößerung der Rosette, hatte aber nicht den hier beschriebenen Phänotyp. Deshalb wurde der Versuch wiederholt. Col-0, *ipt3 ipt5 ipt7*, *ahk2 ahk3* und die beiden AC-Linien #32 und #37 wurden auf Medium mit 30 nM oder 3 µM Cafenstrol angezogen. Während Keimlinge, die mit 3 µM Cafenstrol behandelt wurden, wie von Nobusawa *et al.* (2013) beschrieben starke Wachstumsdefekte zeigten (Daten nicht gezeigt), führt die Behandlung von Wildtypkeimlingen mit 30 nM Cafenstrol zu größeren Blättern (Abb. 27A). Nach 13 TNK wurde der Rosettendurchmesser bestimmt. Dabei zeigte sich, dass allein der Wildtyp, aber keine der verwendeten cytokinindefizienten Pflanzen, eine Cafenstrol-induzierte Blattvergrößerung aufwies (Abb. 27). Die von Nobusawa *et al.* (2013) aufgestellte Hypothese kann demnach nicht bestätigt werden.

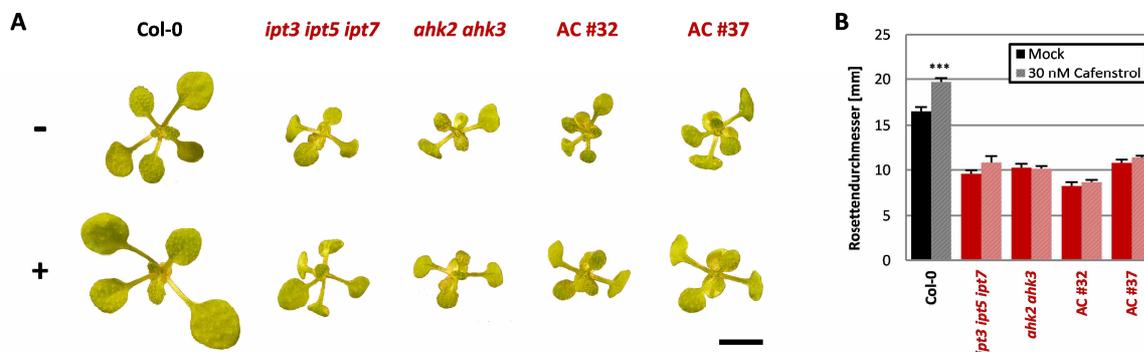


Abb. 27: Cytokinin-defiziente Pflanzen zeigen keine Cafenstrol-induzierte Vergrößerung der Blattrosette. (A) 13 Tage alte Keimlinge von Col-0, *ahk2 ahk3*, *ipt3 ipt5 ipt7* und AC in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) von 30 nM Cafenstrol (Maßstab = 5 mm). **(B)** Rosettendurchmesser 13 Tage alter Keimlinge von Col-0, *ahk2 ahk3*, *ipt3 ipt5 ipt7* und AC in Abwesenheit (Mock) und Anwesenheit von 30 nM Cafenstrol. Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. **(B)** Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 30); *** = p < 0,001 (zweifaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

3.1.7. Die Veränderung des Cytokininstatus in der Epidermis beeinflusst den Übergang von juveniler zu adulter vegetativer Phase und den Blühzeitpunkt

Die nähere Untersuchung der Blattrosette zeigte, dass AL-Pflanzen insgesamt weniger Rosettenblätter bilden, während der geringere Cytokininstatus in den AAS- und AC-Linien zur Ausbildung einer erhöhten Blätterzahl führt (Abb. 19A). Da die *pATML1*-Linien unter Langtagbedingungen nicht über eine veränderte Blattbildungsrate verfügen (Abb. 17A), lassen sich die beobachteten Unterschiede des Blühbeginns bei *pATML1:LOG4*- und *pATML1:CKX1*-exprimierenden Pflanzen (Abb. 8A) nur auf den kürzeren bzw. längeren Verbleib in der vegetativen Phase zurückführen.

Unter induktiven Lichtbedingungen blühen die AL-Linien durchschnittlich 1,8 Tage früher als der Wildtyp (Abb. 28A), unter Kurztagbedingungen sogar 3,5 Tage früher (Abb. 28B). Die Hemmung der Signal-

kaskade in der Epidermis führt nur unter Kurztagbedingungen zu einem messbaren verspäteten Blühbeginn (Abb. 28A und Abb. 28B). Der Blühzeitpunkt der AC-Linien #32 und #37 verzögert sich unter LD-Bedingungen um 5,7 bzw. 2,2 Tage (Abb. 28A). Bei nicht-induktiven Lichtverhältnissen blüht AC #32 sogar 30 Tage später als der Wildtyp (Abb. 28B), wobei einige Pflanzen in den durchgeführten Versuchen die reproduktive Phase nicht erreichten und starben.

Um die Rolle der Epidermis in diesem Prozess zu untersuchen, wurde der Blühzeitpunkt der doppelt transgenen AL AAS-Pflanzen bestimmt. Diese blühen zwar später als AL #22, aber dennoch signifikant früher als der Wildtyp und AAS #12 (Abb. 28C).

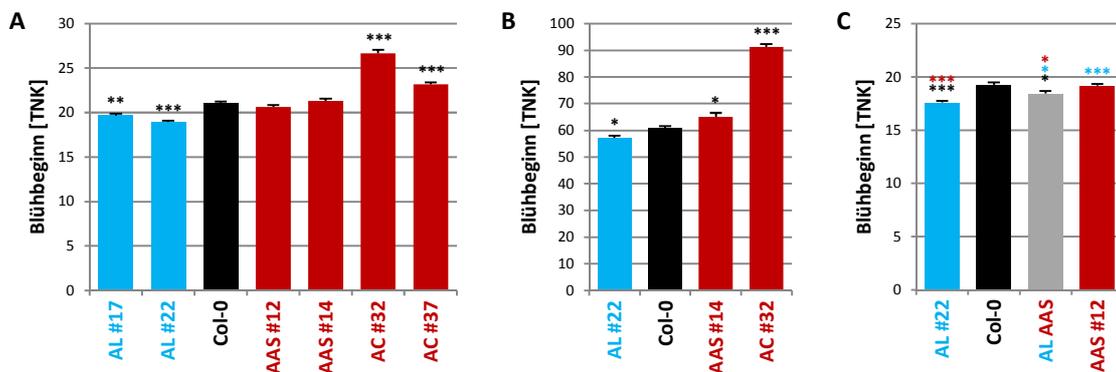


Abb. 28: Blühbeginn der *pATML1*-Linien und der doppelt transgenen AL AAS-Pflanzen. Blühzeitpunkt [TNK] der AL-, AAS- und AC-Linien im Vergleich zu Col-0 **(A)** unter LD-Bedingungen und **(B)** unter SD-Bedingungen. **(C)** Blühzeitpunkt [TNK] der doppelt transgenen AL AAS-Pflanzen unter LD-Bedingungen.

Als Blühbeginn wurde der Zeitpunkt festgelegt, an dem der Infloreszenzstengel eine Länge von 5 mm erreicht hatte. Einige *pATML1:CKX1-4xMyc*-Pflanzen begannen unter SD-Bedingungen nicht zu blühen und gingen ein. Diese Pflanzen sind hier nicht berücksichtigt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) $n = 28-30$; (B) $n = 19-20$; (C) $n = 21-24$). (A, B) * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test). (C) * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, bezogen auf Wildtyp (schwarz), AL #22 (blau) und AAS #12 (rot) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

Bei der genaueren Betrachtung der Rosette der *pATML1:CKX1-4yMyc*-exprimierenden Pflanzen fiel auf, dass sie eine größere Zahl an rundlichen, für die juvenile vegetative Phase typischen Blätter enthielt (Abb. 19A). Dies führte zu der Überlegung, dass Cytokinin den Übergang von der juvenilen in die adulte vegetative Phase und auf diese Weise den Blühbeginn beeinflussen könnte.

Juvenile Blätter haben im Gegensatz zur länglichen und gezahnten adulten Blattform eine eher rundliche Kontur. Außerdem bilden nur adulte Blätter Trichome auf der Blattunterseite aus. Da der letztgenannte Aspekt eine klare Trennung möglich macht, wurde dieser zur Unterscheidung von juvenilen und adulten Blättern herangezogen und die Anzahl der Rosettenblätter bestimmt.

AL-Pflanzen bilden unter Langtagverhältnissen durchschnittlich 0,8 juvenile Rosettenblätter weniger als der Wildtyp, wobei der Unterschied bei der stärker exprimierenden Linie #22 stärker ausfällt als bei Linie #17 (Abb. 29A). Unter Kurztagbedingungen bilden AL-Pflanzen ein juveniles Blatt weniger (Abb. 29B).

Die adulte Phase zeigt keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp, was letztendlich zu insgesamt weniger Rosettenblättern in den AL-Linien führt (Abb. 29A und Abb. 29B).

Von den beiden AAS-Linien zeigt nur Linie #14 eine signifikant längere juvenile Phase, aber auch in Linie #12 ist eine deutliche Tendenz sichtbar (Abb. 29A und Abb. 29B). AC-Pflanzen produzieren unter induktiven Lichtbedingungen durchschnittlich 1,6 juvenile Blätter mehr als Col-0 (Abb. 29A), bei nicht-induktiven Verhältnissen 3,2 juvenile Blätter (Abb. 29B). In der stärkeren Linie #32 ist außerdem die adulte Phase unter Langtagbedingungen verlängert (Abb. 29A).

Die Analyse der doppelt transgenen AL AAS-Pflanzen zeigt, dass im Gegensatz zum Prozess der Blattgrößendetermination kein Einfluss des Cytokininstatus in der Epidermis selbst auf die Länge der juvenilen vegetativen Phase besteht. Die juvenile Phase ist in AL AAS-Pflanzen ebenso stark verkürzt wie in AL-Pflanzen (Abb. 29C).

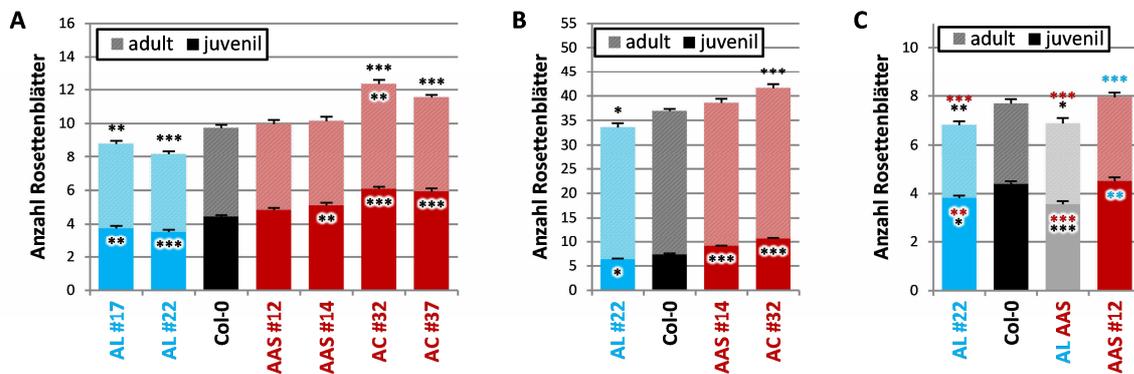


Abb. 29: Der veränderte Cytokininstatus der *pATML1*-Linien wirkt sich auf den Übergang von juveniler zu adulter vegetativer Entwicklungsphase aus. Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter der AL-, AAS- und AC-Linien im Vergleich zu Col-0 (A) unter LD-Bedingungen und (B) unter SD-Bedingungen. (C) Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter der doppelt transgenen AL AAS-Pflanzen unter LD-Bedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) $n = 28-30$; (B) $n = 17-20$; (C) $n = 16$); (A, B) * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test). (C) * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, bezogen auf Wildtyp (schwarz), AL #22 (blau) und AAS #12 (rot) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

3.2. Einfluss von Cytokinin auf Entwicklungsübergänge (Transitionen)

Der Übergang zur reproduktiven Phase wird durch verschiedene endogene und exogene Signale wie Tageslänge, Temperatur und Hormonstatus beeinflusst, die von der Pflanze in mindestens fünf genetisch definierten Signalwegen verarbeitet werden (Fornara *et al.*, 2010; Srikanth & Schmid, 2011). Bereits in den sechziger Jahren wurde eine fördernde Wirkung von Cytokinin im Prozess der Blühinduktion in *Arabidopsis* aufgedeckt (Michniewicz & Kamieńska, 1965). Die Veränderung des pflanzlichen Cytokininstatus führt nicht selten zu einem Einfluss auf den Blühzeitpunkt (z. B. Werner *et al.*, 2003;

Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006; Jensen, 2013). Die Wirkungsweise von Cytokinin in diesem Kontext ist aber immer noch weitgehend ungeklärt.

Die Analyse der *pATML1*-Linien zeigte, dass eine Erhöhung des Cytokininspiegels in einer kürzeren juvenilen Phase resultiert, sodass die Pflanzen mit einer geringeren Anzahl an Blättern zu blühen beginnen (Abb. 28A, Abb. 28B, Abb. 29A und Abb. 29B). Die Verminderung des Cytokininstatus verlängert hingegen die juvenile Phase, was einen verzögerten Blühbeginn zur Folge hat (Abb. 28A, Abb. 28B, Abb. 29A und Abb. 29B). Die lokale Hemmung der Cytokininsignalkaskade in der Epidermis beeinflusst zwar die Anzahl der juvenilen Blätter (AAS, Abb. 29A und Abb. 29B), die Analyse der doppelt transgenen AL AAS-Pflanzen zeigte jedoch keine alleinige Abhängigkeit der Länge der juvenilen Phase vom epidermalen Cytokininstatus (Abb. 29C). Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Rolle von Cytokinin in der Regulation von Entwicklungsübergängen untersucht.

3.2.1. Der Cytokininstatus korreliert negativ mit der Länge der juvenilen vegetativen Phase und positiv mit dem Blühzeitpunkt

Zunächst wurden verschiedene Mutanten und transgene Linien, in denen der Cytokininsignalweg oder -metabolismus verändert ist, hinsichtlich der Transitionen von der juvenilen in die adulte vegetative Phase und von der adulten zur reproduktiven Entwicklungsphase untersucht. Dafür wurde die Anzahl an juvenilen und adulten Blättern sowie der Blühzeitpunkt (TNK) unter SD- und LD-Verhältnissen bestimmt. Genotypen mit einem höheren Cytokininstatus werden in den Abbildungen weiterhin durch blaue Farbe angezeigt, während Linien mit einem verringerten Cytokininstatus rot dargestellt sind.

Unter Langtagbedingungen produziert der Wildtyp durchschnittlich $4,4 \pm 0,1$ juvenile Blätter (Abb. 30A), unter Kurztagbedingungen $7,4 \pm 0,2$ juvenile Blätter (Abb. 30B). Die Erhöhung des Cytokininspiegels in der *ckx3,4,5,6*-Quadrupelmutante führt mit $3,8 \pm 0,1$ (LD) bzw. $6,3 \pm 0,2$ (SD) Blättern zu einer verkürzten juvenilen Phase (Abb. 30A und Abb. 30B). Die konstitutive Aktivität des AHK2-Rezeptors in der *rock2*-Mutante bewirkt ebenfalls eine Verkürzung der juvenilen Phase um $1,1$ (LD) bzw. $1,6$ (SD) Rosettenblätter im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Abb. 30A und Abb. 30B). Die *rock3*-Mutante, die eine *Gain-of-function*-Variante von AHK3 exprimiert, bildet hingegen eine vergleichbare Anzahl an juvenilen Blättern wie der Wildtyp (Abb. 30A und Abb. 30B).

Von den drei Rezeptordoppelmutanten *cre1 ahk2*, *cre1 ahk3* und *ahk2 ahk3* zeigt nur die letztgenannte eine Verlängerung der juvenilen Phase (Abb. 30A und Abb. 30B). *Cre1 ahk3* bildet unter Langtagverhältnissen insgesamt ein Rosettenblatt weniger als der Wildtyp, was auf leichte, aber nicht signifikante Verkürzungen der juvenilen und adulten vegetativen Phase zurückzuführen ist (Abb. 30A). Interessanterweise produziert *ahk2 ahk3* unter induktiven Lichtbedingungen signifikant weniger adulte Blätter

als der Wildtyp, während Kurztagbedingungen zur Ausbildung einer höheren Anzahl an adulten Rosettenblättern führen (Abb. 30A und Abb. 30B).

Die Expression eines *CKX*-Gens unter der Kontrolle der Promotoren *pANT* und *p35S* führt ebenfalls zu einer Verlängerung der juvenilen Phase, wobei der insgesamt stärkste Effekt bei *p35S:CKX1*-Pflanzen sichtbar ist (Abb. 30A und Abb. 30B). *AINTEGUMENTA (ANT)* ist vornehmlich in den Primordien von Kotyledonen, Blättern, Blüten und Blütenorganen aktiv (Elliott *et al.*, 1996; Grandjean *et al.*, 2004), also dort, wo die hier betrachteten Organe entstehen. *pANT:CKX3*-Pflanzen (Holst *et al.*, 2011) und AC #32 sind die einzigen untersuchten Linien, die unter LD-Bedingungen eine erhöhte Anzahl an adulten Rosettenblättern aufweisen (Abb. 29A und Abb. 30A).

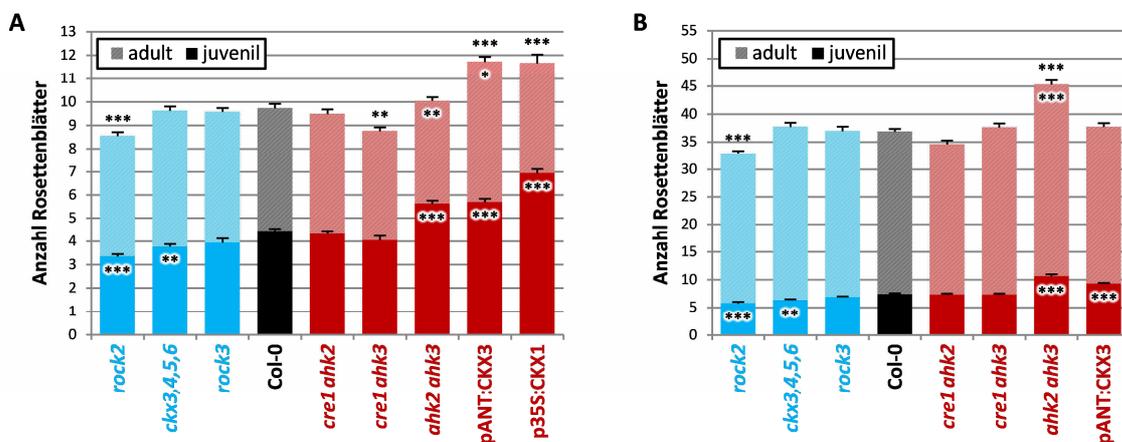


Abb. 30: Der Cytokininstatus in der Pflanze wirkt sich auf die Länge der juvenilen vegetativen Phase aus. Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter von Pflanzen mit einem veränderten Cytokininstatus im Vergleich zu Col-0 **(A)** unter LD-Bedingungen und **(B)** unter SD-Bedingungen.

Die hier gezeigten Genotypen wurden zusammen mit den *pATML1*-Linien untersucht; bei den Wildtyp-Pflanzen handelt es sich deshalb um dieselben, die auch in Abb. 29A und Abb. 29B benutzt wurden. Da *p35S:CKX1*-Pflanzen unter SD-Bedingungen nicht die reproduktive Phase erreichen, wurde auf die Quantifizierung der juvenilen und adulten Rosettenblätter verzichtet. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler **(A)** $n = 15-29$; **(B)** $n = 14-20$; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Die Quadrupelmutante *ckx3,4,5,6* blüht von allen getesteten Linien sowohl unter Kurz- als auch unter Langtagbedingungen am frühesten (Abb. 31A und Abb. 31B), obwohl sie insgesamt etwa genauso viele Rosettenblätter bildet wie die Wildtypkontrolle (Abb. 30A und Abb. 30B), was auf eine erhöhte Blattbildungsrate zurückzuführen ist (Abb. 32A und Abb. 32B). Bei *rock2* korreliert der frühere Blühbeginn hingegen mit der geringeren Anzahl an gebildeten Rosettenblättern (Abb. 30A, Abb. 30B, Abb. 31A, Abb. 31B, Abb. 32A und Abb. 32B). *Rock3* blüht etwa zur gleichen Zeit mit einer vergleichbaren Anzahl an Rosettenblättern wie Wildtyp-Pflanzen (Abb. 30A, Abb. 30B, Abb. 31A, Abb. 31B, Abb. 32A, Abb. 32B).

Cre1 ahk2 blüht unter LD-Verhältnissen etwa genauso spät wie *ahk2 ahk3*, während *cre1 ahk3* etwa zeitgleich mit dem Wildtyp zu blühen beginnt (Abb. 31A). Unter SD-Bedingungen blühen alle drei Rezeptordoppelmutanten später als Col-0, wobei *ahk2 ahk3* mit 17,7 Tagen die größte Differenz zum Wildtyp zeigt (Abb. 31B). Von den drei Doppelmutanten ist nur für *ahk2 ahk3* keine Veränderung des Plastochronindex zu beobachten, weder bei induktiven noch bei nicht-induktiven Lichtverhältnissen (Abb. 32A und Abb. 32B).

Die Expression von *pANT:CKX3* verzögert den Blühbeginn sowohl unter Kurz- als auch unter Langtagbedingungen (Abb. 31A und Abb. 31B). Der Plastochronindex ist im Vergleich zur Wildtypkontrolle nicht verändert (Abb. 32A und Abb. 32B). *p35S:CKX1* blüht unter LD-Bedingungen erst nach $32,2 \pm 0,6$ Tagen und damit 11,2 Tage später als der Wildtyp (Abb. 31A). Hier tritt auch die deutlichste Erhöhung des Plastochronindex auf (Abb. 32A). Unter Kurztagverhältnissen sind *p35S:CKX1*-Pflanzen nicht in der Lage, die reproduktive Phase zu erreichen und sterben vorher.

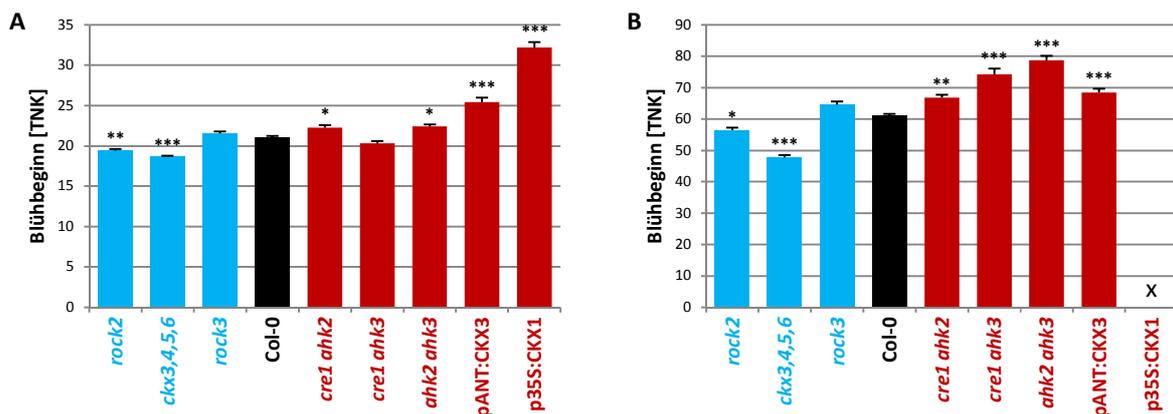


Abb. 31: Der Cytokininstatus der Pflanze beeinflusst den Blühbeginn. Blühzeitpunkt [TNK] von Pflanzen mit einem veränderten Cytokininstatus im Vergleich zu Col-0 (A) unter LD-Bedingungen und (B) unter SD-Bedingungen. Die hier gezeigten Genotypen wurden zusammen mit den *pATML1*-Linien untersucht; bei den Wildtyp-Pflanzen handelt es sich deshalb um dieselben, die auch in Abb. 28A und Abb. 28B benutzt wurden. Als Blühbeginn wurde der Zeitpunkt festgelegt, an dem der Infloreszenzstengel eine Länge von 5 mm erreicht hatte. *p35S:CKX1*-Pflanzen begannen unter SD-Bedingungen nicht zu blühen und gingen ein. Diese Pflanzen sind hier nicht berücksichtigt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) $n = 15-29$; (B) $n = 18-21$); * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

Insgesamt zeigt sich sowohl unter Kurz- als auch unter Langtagbedingungen eine negative Korrelation zwischen dem Cytokininstatus und der Länge der juvenilen vegetativen Phase sowie eine positive Korrelation zwischen Cytokininstatus und Blühbeginn. Der Blühbeginn wird zum einen durch die Blattbildungsrate und zum anderen durch die Anzahl an insgesamt gebildeten Rosettenblättern bestimmt. Unabhängig von der Fotoperiode produzieren Linien mit einem höheren Cytokininstatus weniger juvenile Blätter, während Pflanzen mit einem reduzierten Cytokininstatus eine höhere Anzahl an juvenilen Blättern bilden. Dies führt zu einem kürzeren bzw. längeren Verbleib in der vegetativen Phase. Die Foto-

periode wirkt sich in einigen Fällen auf die Länge der adulten vegetativen Phase aus. So produziert *ahk2 ahk3* beispielsweise nur unter Kurtagbedingungen mehr juvenile Blätter als der Wildtyp. Zusammengefasst mit der Tatsache, dass *p35S:CKX1*-Pflanzen bei Kurtagverhältnissen nicht in der Lage sind von vegetativem auf reproduktives Wachstum umzustellen, deutet dies darauf hin, dass Cytokinin vor allem in der Regulation des Blühbeginns bei nicht-induktiven Lichtverhältnissen eine wichtige Rolle spielt.

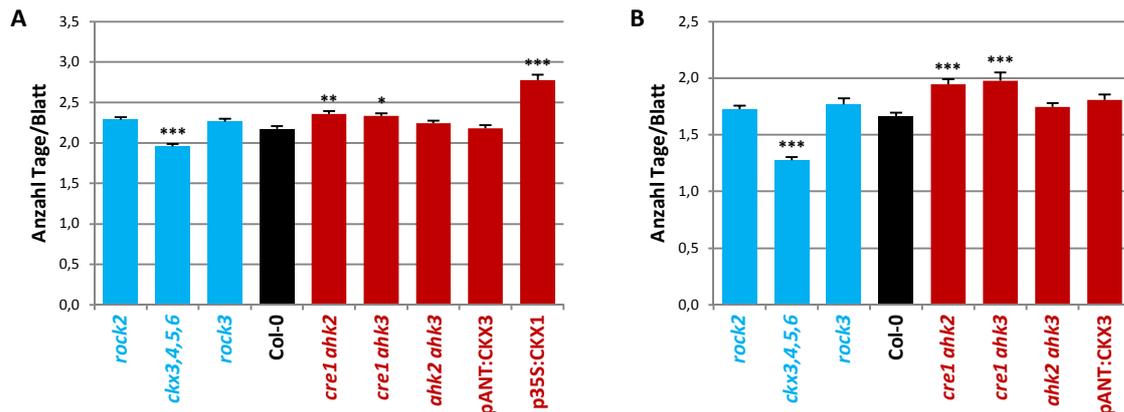


Abb. 32: Plastochronindex verschiedener Pflanzenlinien mit verändertem Cytokininstatus. Blattbildungsrate von Pflanzen mit einem verändertem Cytokininstatus im Vergleich zu Col-0 unter (A) LD-Bedingungen bzw. (B) SD-Bedingungen.

Die hier gezeigten Genotypen wurden zusammen mit den *pATML1*-Linien untersucht; bei den Wildtyp-Pflanzen handelt es sich deshalb um dieselben, die auch in Abb. 17A und Abb. 17B benutzt wurden. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) n = 15-29; (B) n = 14-21); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

3.2.2. Die Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 und der Typ-B-Responseregulator ARR1 sind an der Regulation von Entwicklungsübergängen beteiligt

Die Doppelrezeptormutanten *cre1 ahk2* und *cre1 ahk3* produzieren eine ähnliche Anzahl an juvenilen Blättern wie der Wildtyp (Abb. 30). Da *rock2*, aber nicht *rock3*, eine verkürzte juvenile Phase hat, *ahk2* allerdings nur in Kombination mit *ahk3* zu einer Verlängerung derselben führt (Abb. 30), lässt sich schlussfolgern, dass AHK2 der vermittelnde Rezeptor bei der Regulation der Juvenil-adult-Transition ist, während AHK3 eine unterstützende Rolle zukommt.

Die unveränderten Blattbildungsrate der Linien *rock2*, *rock3* und *ahk2 ahk3* zeigen, dass die beiden Rezeptoren AHK2 und AHK3 den Blühzeitpunkt ausschließlich durch Veränderung der Länge der juvenilen und adulten Phase beeinflussen (Abb. 30, Abb. 31 und Abb. 32). Der frühere Blühbeginn von *rock2* und der spätere Blühzeitpunkt von *ahk2 ahk3* ist aufgrund des unveränderten Plastochronindex auf den kürzeren bzw. längeren Verbleib in der vegetativen Phase zurückzuführen. Bei *rock2* resultiert der

verfrühte Übergang in die reproduktive Phase aus der kürzeren juvenilen Phase, wobei sich in den durchgeführten Experimenten oft auch eine Tendenz zu einer kürzeren adulten Phase zeigt (s. Abschnitt 3.2.7). *Ahk2 ahk3* produziert unabhängig von den Lichtbedingungen mehr juvenile Blätter als der Wildtyp. Die adulte Phase ist unter Kurztagverhältnissen auch verlängert, während sie bei Langtagverhältnissen verkürzt ist.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Cytokininrezeptor AHK2, unterstützt von AHK3, bei der Regulation der Juvenil-adult-Transition und des Blühbeginns eine wichtige Funktion übernimmt. CRE1/AHK4 beeinflusst den Blühbeginn hingegen eher durch eine Veränderung der Blattbildungsrate.

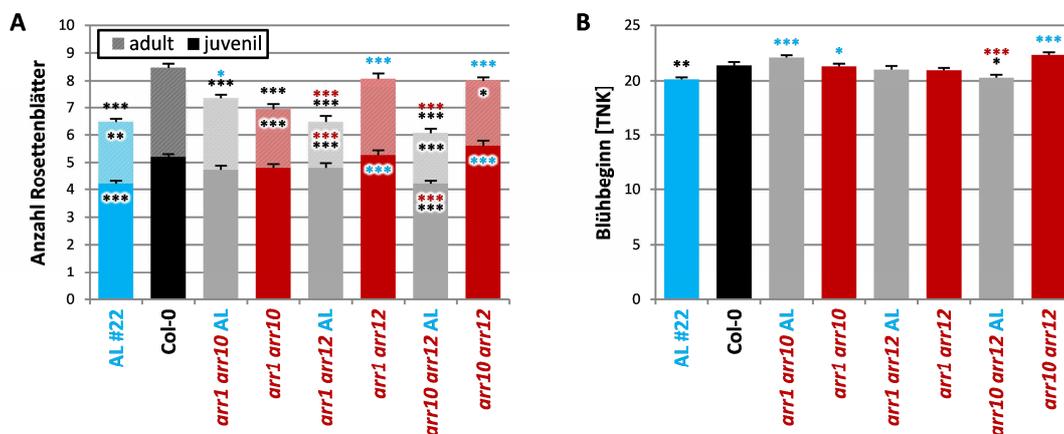


Abb. 33: Auswirkungen der *pATML1:LOG4*-Expression auf die Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter in den Doppelmutanten *arr1 arr10*, *arr1 arr12* und *arr10 arr12*. (A) Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter und (B) Blühzeitpunkt [TNK] von *arr1 arr10* AL, *arr1 arr12* AL und *arr10 arr12* AL im Vergleich zu Col-0 und der entsprechenden Doppelmutanten.

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Bilder repräsentativer Pflanzen sind in Abb. 24A gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) $n = 15$; (B) $n = 27-28$); * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, bezogen auf Wildtyp (schwarz), AL #22 (blau) und die entsprechende *ARR*-Doppelmutante (rot) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Keine der drei Typ-B-*ARR*-Doppelmutanten *arr1 arr10*, *arr1 arr12* und *arr10 arr12* unterscheidet sich in der Länge der juvenilen Phase oder dem Blühbeginn vom Wildtyp (Abb. 33). Um an der Regulation der Entwicklungsübergänge beteiligte Typ-B-ARRs zu identifizieren, wurden die in Abschnitt 3.1.5 beschriebenen dreifach homozygoten Linien verwendet, die durch Kreuzung der *pATML1:LOG4*-Linie #22 (AL #22) mit den Doppelmutanten *arr1 arr10*, *arr1 arr12* und *arr10 arr12* generiert wurden.

Die Typ-B-*ARR*-Doppelmutanten bilden eine ähnliche Anzahl an juvenilen Blättern wie der Wildtyp, die Rosetten von *arr1 arr10* und *arr10 arr12* weisen allerdings weniger adulte Blätter auf (Abb. 33A). Die Expression von *pATML1:LOG4* führt in den Doppelmutanten *arr1 arr10* und *arr1 arr12* nicht zu einer verringerten Anzahl an juvenilen Blättern, jedoch bewirkt sie eine Verkürzung der adulten Phase bei *arr1 arr12* AL (Abb. 33A). Im *arr10 arr12*-Hintergrund hat die Transgenexpression hingegen eine

deutliche Verringerung der juvenilen Blätterzahl um 1,4 Blätter zur Folge, womit die juvenile vegetative Phase etwa genauso lang ist wie in AL-Pflanzen (Abb. 33A). Aus den Ergebnissen lässt sich eine Beteiligung von *ARR1* an der Regulation des Juvenil-adult-Übergangs folgern. Da keine Einzelmutanten untersucht wurden, bleibt die Rolle von *ARR10* und *ARR12* unklar, diesen könnte aber eine unterstützende Funktion zukommen.

Wie bei der Analyse der Blattidentitäten offenbart die Untersuchung des Blühzeitpunktes nur einen Effekt des *pATML1:LOG4*-Transgens im Hintergrund von *arr10 arr12*. *Arr10 arr12* AL-Pflanzen blühen fast genauso früh wie AL-Pflanzen, während sich *arr1 arr10* AL und *arr1 arr12* AL hinsichtlich des Blühzeitpunktes nicht signifikant von Col-0, *arr1 arr10* und *arr1 arr12* unterscheiden (Abb. 33). Dies lässt auf eine prominente Rolle von *ARR1* bei der Regulation des Blühzeitpunktes schließen. Allerdings korrelieren die Blühzeitpunkte der getesteten Linien nicht mit der Gesamtblätterzahl, was auf einen Einfluss der Typ-B-ARRs auf die Blattbildungsrate hindeutet.

3.2.3. Cytokinin beeinflusst die Expression von Komponenten des miR156-abhängigen autonomen Signalwegs

Da die Auswirkungen von Cytokinin auf die Länge der juvenilen Phase in den vorangegangenen Experimenten in cytokinindefizienten Pflanzen besonders deutlich zu beobachten waren, wurden verschiedene Pflanzenlinien mit verringertem Cytokininstatus für eine Expressionsstudie genutzt. Da die bisherigen Analysen eine Beteiligung von *AHK2*, *AHK3* und *ARR1* bei der Regulation von Entwicklungsübergängen suggerierten, wurden neben den AC-Linien #32 und #37 die Doppelmutanten *ahk2 ahk3*, *arr1 arr10* und *arr1 arr12* auf die Expression von Genen untersucht, die die Transitionen von juveniler zu adulter vegetativer Phase und von adulter zu reproduktiver Phase regulieren.

Zwei evolutionär hochkonservierte microRNAs (miRNAs), miR156 und miR172, und ihre jeweiligen Zielgene wurden als Schlüsselkomponenten der genetischen Mechanismen identifiziert, welche die pflanzlichen Entwicklungsübergänge sowie einige der damit einhergehenden heteroblastischen Merkmale kontrollieren (Huijser & Schmid, 2011). Während miR156 Juvenilität fördert, begünstigt miR172 das Adultstadium und den Übergang zu reproduktivem Wachstum (Wu *et al.*, 2009). Die Vorstufen der miR156 (pri-miR156) werden von acht Genen kodiert (*MIR156A-H*), die miR172-precursor (pri-miR172) von fünf Genen (*MIR172A-E*) (Xie *et al.*, 2005).

Die verschiedenen Linien wurden unter SD-Bedingungen angezogen und im 7- und 11-Blatt-Stadium wurde Sprossmaterial für die Transkriptanalyse geerntet, um die Zusammensetzung der Rosette aus einer unterschiedlichen Anzahl an juvenilen und adulten Blättern auch auf molekularer Ebene nachzuweisen.

Im 7-Blatt-Stadium zeigt sich mit Ausnahme von *arr1 arr12* in allen Linien eine verringerte Abundanz von pri-miR156a im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 34A), während im 11-Blatt-Stadium kaum eine Änderung feststellbar ist (Abb. 34B). Nur die AC-Linie #32 zeigt eine fast zweifache Erhöhung der Primärtranskriptmenge (Abb. 34B). Für pri-miR172b konnte für alle Linien eine Verminderung der Transkriptabundanz gemessen werden, nur im 11-Blatt-Stadium von *arr1 arr10* befindet sich das Expressionslevel auf Wildtypniveau (Abb. 34C und Abb. 34D). Die stärkste Primärtranskriptreduktion zeigen die AC-Linien und *ahk2 ahk3* (Abb. 34C und Abb. 34D).

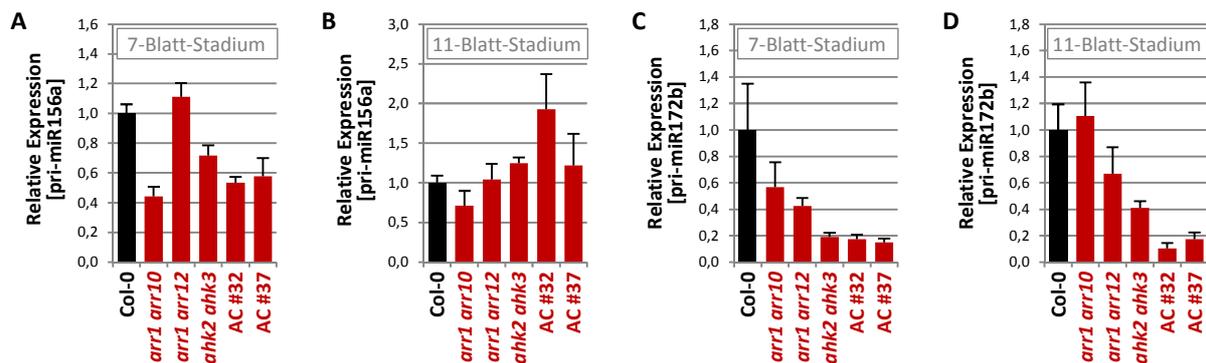


Abb. 34: Expression von pri-miR156a und pri-miR172b in Cytokinin-defizienten Pflanzen. Expressionslevel von (A, B) pri-miR156a und (C, D) pri-miR172b in Sprossmaterial (A, C) siebenblättriger bzw. (B, D) elfblättriger Pflanzen. Dargestellt sind relative Werte von *arr1 arr10*, *arr1 arr12*, *ahk2 ahk3*, AC #32 und AC #37 im Vergleich zum Wildtyp (Col-0), welcher auf 1 gesetzt wurde.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter SD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4); *TAFII15* diente als Referenzen.

Auch die Expressionslevel der Zielgene der beiden miRNAs wurden analysiert. Die Zielgene der miR156 kodieren für Transkriptionsfaktoren der SPL-Familie (SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE), während miR172 den Abbau von Transkripten der *APETALA2(AP2)-like*-Gene *AP2*, *TARGET OF EAT 1 (TOE1)*, *TOE2*, *TOE3*, *SCHLAFMÜTZE (SMZ)* und *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)* vermittelt. Da die größten Expressionsunterschiede für pri-miR156a und pri-miR172b in den AC-Linien und *ahk2 ahk3* gemessen wurden, wurden nur diese für die weiteren Transkriptanalysen verwendet. Als Material wurde das 11-Blatt-Stadium herangezogen, da hier die Unterschiede in der Rosettenzusammensetzung aus juvenilen und adulten Blättern am größten sein sollten (s. Abb. 29B und Abb. 30B).

Die Transkriptabundanz von *SPL2*, *SPL9*, *SPL10* und *SPL11* zeigen in Sprossmaterial elfblättriger, cytokinindefizienter Pflanzen kaum Unterschiede zur Wildtypkontrolle (Abb. 35A und Abb. 35C). Das Expressionslevel von *SPL15* ist in cytokinindefizienten Pflanzen etwa auf die Hälfte reduziert, während die Expression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* z. T. deutlich erhöht ist (Abb. 35B und Abb. 35C).

Die Expressionslevel von *SMZ* und *SNZ* zeigen in der AC-Linie #32 eine Erhöhung um das 2,6- bzw. 1,8-fache des Wildtypniveaus, während die Transkriptmenge von *SNZ* in *ahk2 ahk3* und AC #37 eher

verringert ist (Abb. 35D). Die *AP2*- und *TOE2*-Expression ist in allen getesteten Linien nahezu unverändert (Abb. 35D und Abb. 35E). Die Transkriptmengen von *TOE1* und *TOE3* sind hingegen in den cytokinin-defizienten Pflanzen z. T. deutlich reduziert (Abb. 35E).

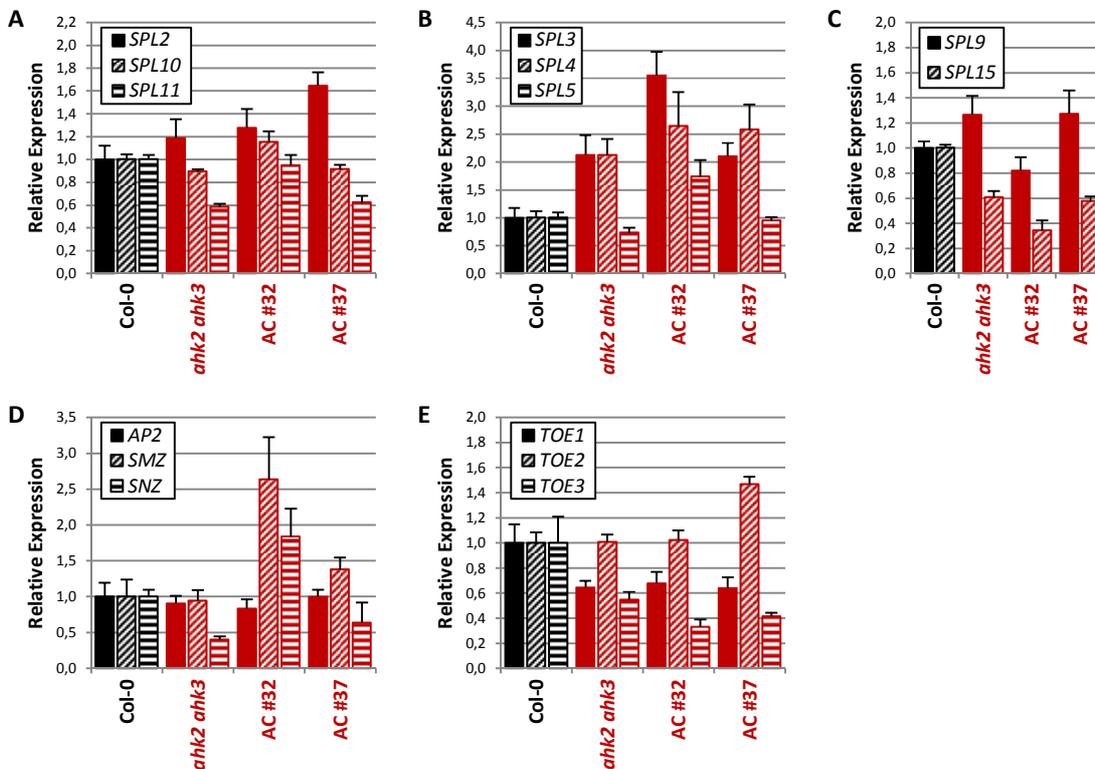


Abb. 35: Expression von Zielgenen der microRNAs miR156 und miR172 in Cytokinin-defizienten Pflanzen. Expressionslevel von (A) *SPL2*, *SPL10*, *SPL11*, (B) *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, (C) *SPL9*, *SPL15*, (D) *AP2*, *SMZ*, *SNZ*, (E) *TOE1*, *TOE2* und *TOE3* in Sprossmaterial elfblättriger Pflanzen. Dargestellt sind relative Werte von *ahk2 ahk3*, AC #32 und AC #37 im Vergleich zum Wildtyp (Col-0), welcher auf 1 gesetzt wurde. Die verwendeten Pflanzen wurden unter SD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4); *TAFII15* diente als Referenzgen.

Die Verwendung ganzer Rosetten lieferte nur ein grobes Bild der molekularen Abläufe, deutete aber vor allem auf eine Korrelation des Cytokininstatus und der Expression von miR172 hin. Um ein detaillierteres Bild zu erhalten, wurden Wildtyp und AC #32 unter Langtagbedingungen angezogen und nach Erreichen der reproduktiven Phase wurden drei definierte Blätter (das vierte, sechste und achte Rosettenblatt) geerntet. Beim Wildtyp stellte das sechste Rosettenblatt das erste adulte dar, während die AC-Linie #32 acht bzw. neun juvenile Blätter produzierte. Die Einzelblattproben wurden daraufhin auf die Expression mehrerer *MIR156*- und *MIR172*-Gene untersucht sowie auf die Abundanz der reifen microRNAs.

In der AC-Linie zeigen drei von vier getesteten pri-miR156-Transkripten eine deutlich höhere Expression im Vergleich zu den Wildtypblättern (Abb. 36A). Dabei zeigt nur die pri-miR156a die erwartete Expressionsabnahme von Blatt zu Blatt (Abb. 36A). Im Gegensatz dazu sind zwei von drei getesteten miR172-Primärtranskripten in *pATML1:CKX1-4xMyc*-exprimierenden Blättern z. T. bis zum Rand des

Detektionslimits reduziert (Abb. 36B). Eine blattweise Zunahme der Expression konnte nur für pri-miR172b nachgewiesen werden (Abb. 36B).

Da das Vorhandensein der jeweiligen Primärtranskripte nicht darauf schließen lässt, inwiefern diese auch zu reifen microRNAs prozessiert werden, wurden darüber hinaus mithilfe einer qRT-basierten Methode auch die Level der reifen miR156 und miR172 gemessen. Aufgrund kleiner Unterschiede in der Sequenz einiger kodierender Gene und damit auch der reifen miRNAs, beschränkt sich der Nachweis auf einen Großteil der reifen miRNAs (miR156a-f, miR172a, b, e). Interessanterweise ist in den Blättern der AC-Linie #32 kaum noch ein Unterschied in der Abundanz der reifen miR156 nachzuweisen (Abb. 36C), während die reife miR172 in sehr viel geringerer Menge vorliegt (Abb. 36D). Das sechste Blatt, das im Wildtyp das erste adulte Rosettenblatt darstellte, enthält eine fast neunfach höhere Anzahl an miR172-Molekülen (Abb. 36D). Da sich das Expressionslevel der miR156-Zielgene auf die Expression der *MIR172*-Gene auswirkt (Wu *et al.*, 2009), könnte nicht nur die Abundanz der beiden miRNAs von Bedeutung sein, sondern auch deren Verhältnis eine entscheidende Rolle für den Zeitpunkt der Juvenil-adult-Transition spielen. Trotz der etwas geringeren Menge an miR156 in der AC-Linie #32 ist der Quotient miR172a, b, e/miR156a-f in allen drei Wildtyp-Blättern höher als in den entsprechenden Rosettenblättern von AC #32, im sechsten Blatt beispielsweise um den Faktor 6 (Abb. 36E).

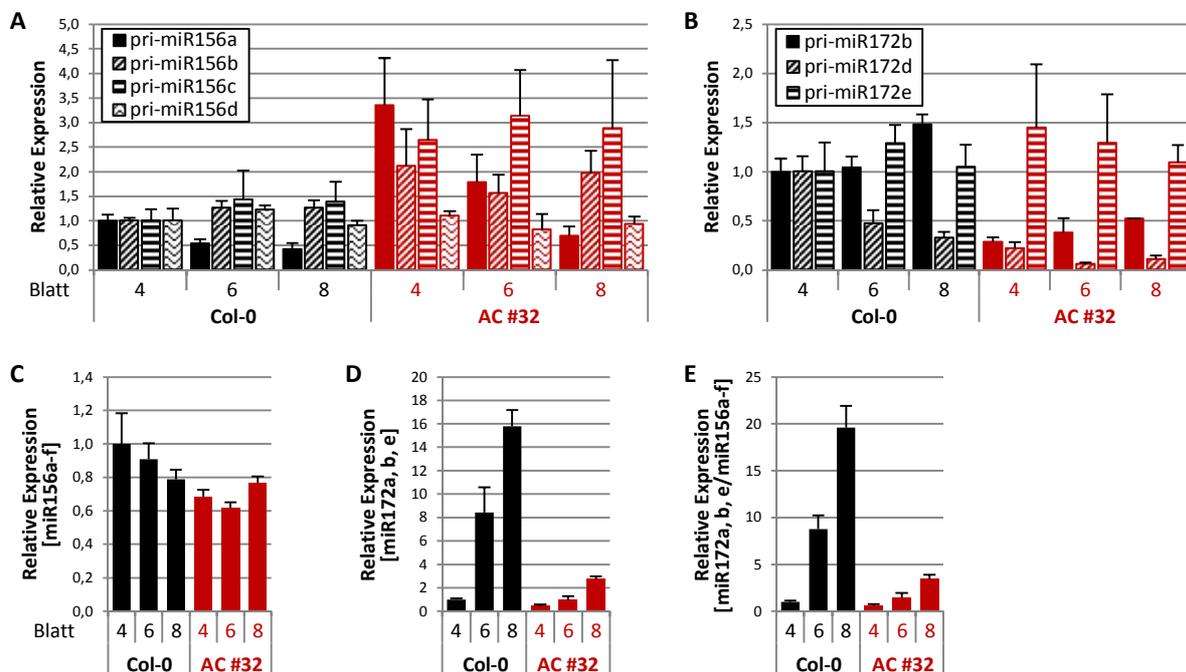


Abb. 36: Der verringerte Cytokininstatus in pATML1:CKX1-4xMyc bewirkt eine Reduktion des Levels an reifer miR172. Expressionslevel von (A) pri-miR156a, pri-miR156b, pri-miR156c und pri-miR156d, (B) pri-miR172b, pri-miR172d und pri-miR172e, (C) miR156a-f und (D) miR172a, b, e in den Rosettenblättern 4, 6 und 8 von Col-0 und AC #32; (E) Expressionsverhältnis, ausgedrückt als Quotient aus miR172a, b, e und miR156a-f. Dargestellt sind relative Werte von AC #32 und Wildtyp; Blatt 4 des Wildtyps wurde auf 1 gesetzt. Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3); (A, B) *TAF115* und *AT5G15710* bzw. (C-E) *TAF115* dienten als Referenzgene.

Die *Arabidopsis*-SPLs werden in mindestens zwei Gruppen unterteilt, die von *SPL3* und *SPL9* repräsentiert werden (Guo *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2010). Die Einzelblattstudie zeigt erneut eine stärkere Expression der Mitglieder der *SPL3*-Gruppe (*SPL3*, *SPL4* und *SPL5*) in Reaktion auf Cytokindefizienz (Abb. 37A). Die stärkste Expressionserhöhung ist für *SPL4* zu beobachten; die Expression fällt viermal höher aus als im Wildtyp (Abb. 37A). Die erwartete Reduktion der Expressionslevel von Blatt zu Blatt ist nur für *SPL3* im Wildtyp nachzuweisen. Von den drei getesteten *SPL9*-Gruppenmitgliedern (*SPL9*, *SPL10* und *SPL15*) zeigen nur *SPL9* und *SPL15* Expressionsunterschiede (Abb. 37B). Die Transkriptmenge von *SPL9* ist in Blatt 4 und 8 auf etwa die Hälfte reduziert, die Expression von *SPL15* ist in Blatt 6 und 8 zweifach erhöht (Abb. 37B).

Bis auf *TOE2* ist die Expression aller Zielgene der *miR172* im vierten AC-Blatt im Vergleich zum vierten Wildtypblatt um mindestens die Hälfte reduziert (Abb. 37C und Abb. 37D). *TOE3* und *SNZ* zeigen im Vergleich zum Wildtyp in Blatt 8 eine Verdopplung des Expressionslevels; *TOE2* und *SMZ* sind im sechsten und achten Blatt stärker exprimiert, in Blatt 8 der AC-Linie #32 ist die *SMZ*-Expression sogar um den Faktor 8,4 erhöht (Abb. 37C und Abb. 37D).

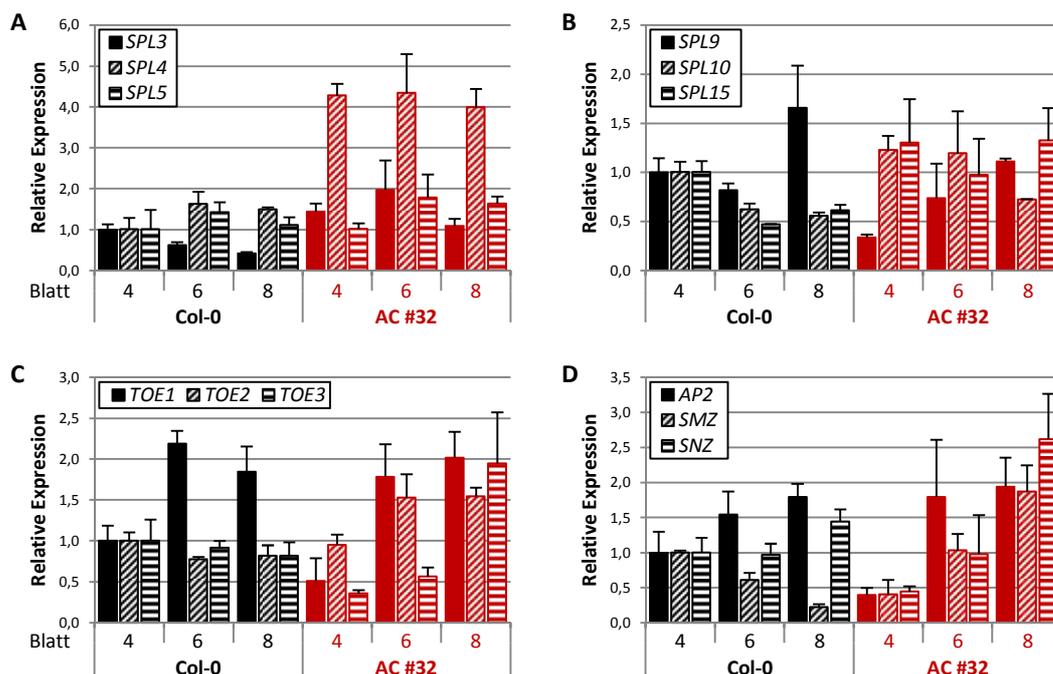


Abb. 37: Der verringerte Cytokininstatus in *pATML1:CKX1-4xMyc* hat Auswirkungen auf die Expression der Zielgene von *miR156* und *miR172*. Expressionslevel von (A) *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, (B) *SPL9*, *SPL10*, *SPL15*, (C) *TOE1*, *TOE2*, *TOE3*, (D) *AP2*, *SMZ* und *SNZ* in den Rosettenblättern 4, 6 und 8 von Col-0 und AC #32. Dargestellt sind relative Werte von AC #32 und Wildtyp, welcher auf 1 gesetzt wurde.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3); *TAFII15* und *AT5G15710* dienten als Referenzgene.

Die erhobenen Expressionsdaten deuten vor allem auf einen Einfluss von Cytokinin auf die Expression der *MIR172*-Gene hin (Abb. 34C, Abb. 34D, Abb. 36B und Abb. 36D). Außerdem konnte ein verstärktes

Ablesen der *MIR156*-Gene in der AC-Linie #32 nachgewiesen werden, das aber keinen Einfluss auf die Abundanz der reifen miR156 im Vergleich zum Wildtyp zeigt (Abb. 34B, Abb. 36A und Abb. 36C). Unter den Zielgenen der miR172 ist nur für *SMZ* ein eindeutiger Trend zu beobachten: Cytokinindefizienz führt zu einer deutlichen Verstärkung der Genaktivität (Abb. 35D und Abb. 37D). Bei den getesteten miR156-Zielgenen zeigt sich vor allem eine durch den verringerten Cytokininstatus hervorgerufene Erhöhung des Expressionslevels von Genen der *SPL3*-Gruppe (Abb. 35B und Abb. 37A).

3.2.4. Der Gibberellin Gehalt ist in cytokinindefizienten Pflanzen erhöht

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine fördernde Wirkung von Cytokinin auf die miR172-Abundanz hin, auf der Ebene der reifen miR156 war kaum ein Einfluss feststellbar. Daher stellt sich die Frage, wodurch die erhöhte Genexpression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* in cytokinindefizienten Pflanzen zustande kommt.

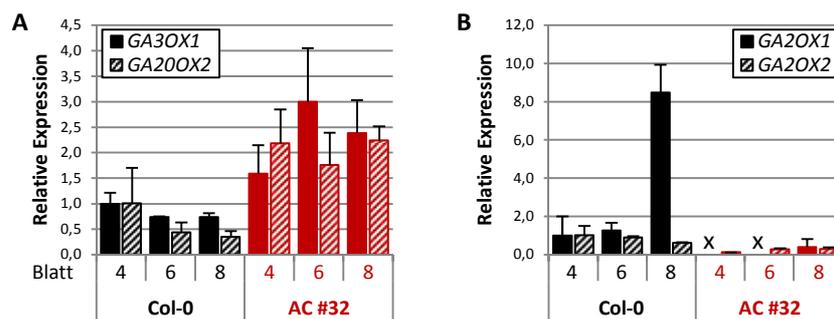


Abb. 38: Der verringerte Cytokininstatus in pATML1:CKX1-4xMyc hat Auswirkungen auf die Expression von Genen des Gibberellinmetabolismus. Expressionslevel von (A) *GA3OX1*, *GA20OX2*, (B) *GA2OX1* und *GA2OX2* in den Rosettenblättern 4, 6 und 8 von Col-0 und AC #32. Dargestellt sind relative Werte von AC #32 und Wildtyp, welcher auf 1 gesetzt wurde.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3); *TAFII15* und *AT5G15710* dienten als Referenzgene.

Zum einen ist bekannt, dass miR172 die Expression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* induziert und dass diese Regulation unabhängig von miR156 ist (Wu *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2011). Zum anderen ist aber auch ein Einfluss von Gibberellin (GA) dokumentiert. GA fördert die Transition zur reproduktiven Phase durch Degradation von DELLA-Transkriptionsrepressoren. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene DELLA-Proteine mit SPLs interagieren und ihre Proteinaktivitäten hemmen (Yu *et al.*, 2012; Hyun *et al.*, 2016). Aber auch ein Einfluss von GA auf Transkriptionsebene ist bekannt. Die Behandlung von *Arabidopsis*-Pflanzen mit dem GA-Biosynthese-Inhibitor Paclobutrazol supprimiert die *SPL3*-Transkription (Jung *et al.*, 2012a). *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* werden unter Kurztagbedingungen durch SOC1 in Abhängigkeit von GA induziert (Jung *et al.*, 2012a), unter Langtagbedingungen induziert GA die Expression der drei *SPL*-Gene

unabhängig von SOC1 (Galvão *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012a; Porri *et al.*, 2012). Im Einklang mit diesen Funden zeigt die Expressionsanalyse von Genen des GA-Metabolismus eine verstärkte Aktivität der GA-Biosynthese-Gene *GA3OX1* und *GA20OX2* in Blättern der AC-Linie #32 im Vergleich zu Wildtypblättern (Abb. 38A), während die für Enzyme des GA-Katabolismus kodierenden Gene *GA2OX1* und *GA2OX2* kaum nachweisbar sind (Abb. 38B).

Diese Daten deuten auf einen erhöhten Gibberellinspiegel in den Blättern *pATML1:CKX1-4xMyc*-exprimierender Pflanzen hin. Aus diesem Grund wurden in Kooperation mit Dr. Danuše Tarkowská (Palacký Universität, Olomouc, Tschechien) GA-Messungen in Sprossmaterial 15 Tage alter Pflanzen durchgeführt. Getestet wurden *rock2*, AL #22, Col-0, *ahk2 ahk3* und AC #32. Die Rohdaten sind in Tab. S3 zu finden.

Der GA-Gehalt in der AC-Linie #32 ist im Vergleich zum Wildtyp um 24 % erhöht, was vor allem von den am C₁₃ nicht hydroxylierten Metaboliten herrührt (Tab. 28). Dies trifft in etwas geringerem Maße auch auf *ahk2 ahk3* zu, auch wenn der Unterschied zu den Wildtypwerten nicht signifikant ist (Tab. 28). Für *rock2* und AL #22 konnten hingegen keine deutlichen Unterschiede gemessen werden (Tab. 28). Interessanterweise ist das GA₁₂-Aldehyd, die direkte Vorstufe aller GA-Metabolite, sowohl in den Linien mit höherem Cytokininstatus als auch in den cytokinindefizienten Linien deutlich verringert (Tab. 28).

Tab. 28: Gibberellengehalt in *rock2*, *pATML1:LOG4*, Col-0, *ahk2 ahk3* und *pATML1:CKX1-4xMyc*.

Genotyp	GAs (C ₁₃ nicht hydroxyliert)	GAs (C ₁₃ hydroxyliert)	GAs (gesamt)	GA ₁₂ -Aldehyd
<i>rock2</i>	7.76 ± 0.32	4.60 ± 0.15	12.35 ± 0.18	27.61 ± 1.36 ***
AL #22	7.47 ± 0.33	3.96 ± 0.31	11.43 ± 0.45	19.44 ± 1.54 ***
Col-0	6.86 ± 0.56	5.01 ± 0.48	11.87 ± 0.85	41.25 ± 2.51
<i>ahk2 ahk3</i>	8.48 ± 0.49	5.21 ± 0.23	13.69 ± 0.40	25.93 ± 1.64 ***
AC #32	8.99 ± 0.56 *	5.73 ± 0.43	14.72 ± 0.96 *	14.48 ± 0.37 ***

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Ganze Rosetten 15 Tage alter Pflanzen wurden geerntet. Die Werte sind in pg/mg FG ± Standardfehler angegeben (n = 4). * = p < 0,05, *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

Die bioaktiven GA-Metabolite werden in der Pflanze durch sequentielle Aktivität der GA20ox- und GA3ox-Enzyme hergestellt. GA₁₂ ist Vorstufe aller Metabolite, die am C₁₃-Atom nicht hydroxyliert sind und aus denen letztendlich die bioaktiven Formen GA₄ und GA₇ entstehen. Durch Hydroxylierung von GA₁₂ entsteht außerdem GA₅₃, Vorstufe aller am C₁₃ hydroxylierten Formen, aus denen die bioaktiven Metabolite GA₁, GA₃, GA₅ und GA₆ gebildet werden (Yamaguchi, 2008).

Alle analysierten Genotypen enthalten mehr GA₁₂, die höchsten Werte wurden in *ahk2 ahk3* und AC #32 gemessen (Abb. 39A). Für GA₅₃ zeigen sich nur in *rock2* höhere Messwerte, ansonsten konnte in keiner anderen Linie ein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 39A).

Die Wichtigkeit der einzelnen bioaktiven GA-Formen kann von Pflanzenspezies zu Pflanzenspezies sehr unterschiedlich sein. GA₁ wurde in einer Vielzahl von Pflanzenspezies nachgewiesen und zählt damit zu den wichtigsten bioaktiven GA-Metaboliten (MacMillan, 2001). Die Messungen zeigen eine Reduktion des Metabolits in den cytokinindefizienten Genotypen; in AC #32 ist GA₁ sogar auf unter die Hälfte des Wildtyp-Wertes reduziert (Abb. 39B). GA₃ ist in keiner der getesteten Linien verändert (Abb. 39B). Für GA₅ und GA₆ wurden in den cytokinindefizienten Linien zum Teil deutlich höhere Werte gemessen als für die Wildtypkontrolle. GA₅ ist in *ahk2 ahk3* und AC #32 um rund 85 % erhöht, GA₆ um 141 % bzw. 55 %. GA₅ ist zudem in *rock2* um 60 % reduziert (Abb. 39B).

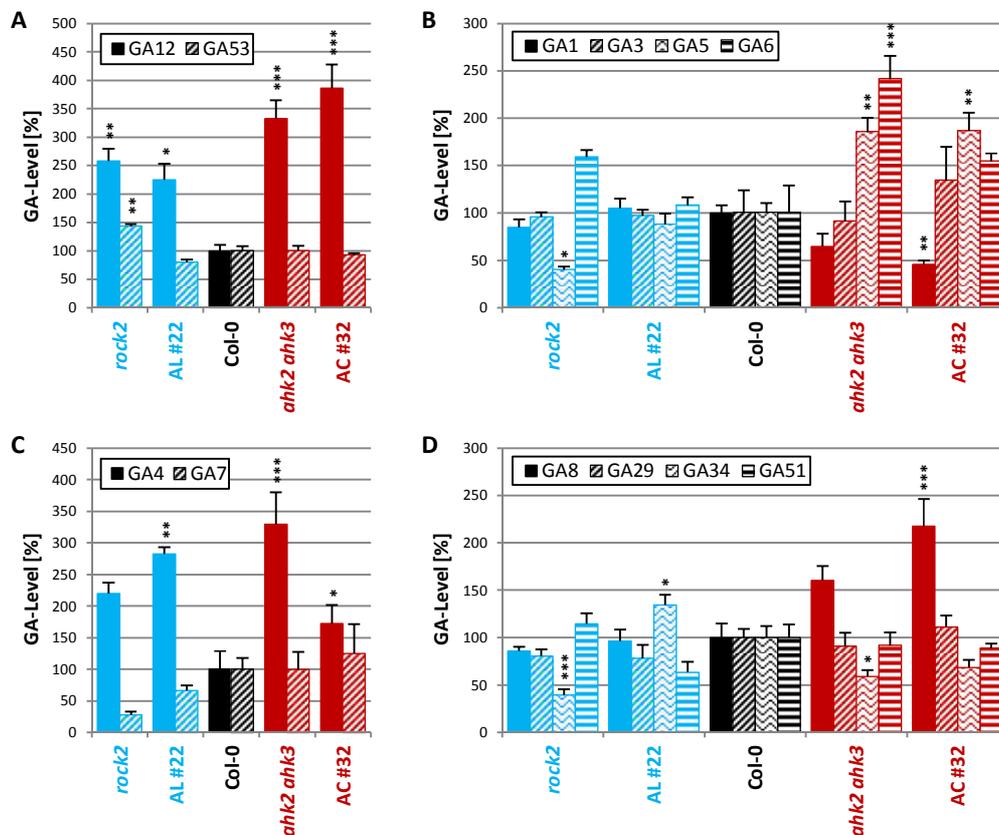


Abb. 39: Einfluss des Cytokininstatus auf den Gibberellengehalt im Spross. Menge an (A) GA₁₂, GA₅₃, (B) GA₁, GA₃, GA₅, GA₆, (C) GA₄, GA₇, (D) GA₈, GA₂₉, GA₃₄ und GA₅₁ in *rock2*, AL #22, Col-0, *ahk2 ahk3* und AC #32.

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Ganze Rosetten 15 Tage alter Pflanzen wurden geerntet. Angegeben sind relative Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4) im Vergleich zum Wildtyp, der auf 100 % gesetzt wurde. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 (einfaktorielle ANOVA, Dunnett-Test).

Man geht davon aus, dass GA₄ die wichtigste bioaktive Form in *Arabidopsis thaliana* darstellt (Yamaguchi, 2008). Alle getesteten Linien zeigen eine Erhöhung der GA₄-Abundanz (Abb. 39C). Zwischen der Konzentration von GA₇ und dem Cytokininstatus zeigt sich eine positive Korrelation (Abb. 39C).

Die Metabolite GA₈, GA₂₉, GA₃₄ und GA₅₁ entstehen durch die Aktivitäten der GA2ox-Enzyme, welche durch Deaktivierung verschiedener GA-Metabolite die Menge an bioaktiven GA-Formen reduzieren

(Yamaguchi, 2008). GA_{29} und GA_{51} zeigen keine Veränderungen im Vergleich zu den Messwerten des Wildtyps (Abb. 39D). Die GA_{32} -Level sind in *rock2*, *ahk2 ahk3* und AC #32 reduziert, während sie in AL #22 leicht erhöht sind (Abb. 39D). Für GA_8 , das durch Deaktivierung von GA_1 entsteht, konnte eine starke Erhöhung in cytokinindefizienten Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 39D).

3.2.5. Cytokinin induziert die Expression von miR172

Um den Einfluss von Cytokinin auf die Expression der *MIR156*- und *MIR172*-Gene sowie von deren Zielgenen direkt zu messen, wurden *Arabidopsis*-Keimlinge des Ökotyps Col-0 in Flüssigkultur angezogen und zehn TNK wurde Benzyladenin (BA) mit einer Endkonzentration von 1 μ M ins Medium gegeben (Zeitpunkt 0). In einem Zeitraum von 24 Stunden wurden zu definierten Zeitpunkten Keimlinge geerntet, um anschließend die Kinetik der Genexpression in Reaktion auf die Cytokininbehandlung zu analysieren. Als Induktionskontrolle wurde die Genexpression von *ARR4* und *ARR6* gemessen. Für die beiden Typ-A-Responseregulatorgene konnte gezeigt werden, dass sie bereits 15 min nach Cytokininbehandlung stark hochreguliert sind (Brenner *et al.*, 2005). Als primäre Cytokininantwortgene zeigen diese in Bezug auf die unbehandelten Kontrollpflanzen (Mock) eine Expressionsänderung von 4,5 bzw. 2,2 innerhalb der ersten Stunde (Abb. 40A). Die Expression von *ARR4* verringert sich im weiteren Verlauf des Experiments wieder etwas, bleibt dabei aber weiterhin auf erhöhtem Niveau (Abb. 40A). Das *ARR6*-Expressionslevel steigt hingegen kontinuierlich an (Abb. 40A). Die Induktion von *ARR4* und *ARR6* fällt insgesamt moderat aus, ist aber dennoch eindeutig.

Die *MIR156*-Primärtranskripte pri-miR156a und pri-miR156c zeigen im Verlauf des Experiments eine Abnahme der Expression, am Ende wieder eine leichte Zunahme (Abb. 40B). Die mit Cytokinin behandelten Keimlinge weisen dabei die meiste Zeit über eine geringere Expression auf als die Kontrollpflanzen (Abb. 40B und Abb. 40C). Die Abundanz der reifen miR156 zeigt im Unterschied zur Expression der beiden getesteten Gene *MIR156A* und *MIR156C* keine starken Abweichungen von den Kontrollwerten, mit Ausnahme eines kurzen Expressionsanstiegs nach einer Stunde (Abb. 40F).

Mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP), gefolgt von der Sequenzierung der gebundenen DNA identifizierten Nagel *et al.* (2015) neue potenzielle Zielgene des *MYB-like*-Transkriptionsfaktors CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (*CCA1*), der an das sog. *evening motif* in der Promotorregion seiner Zielgene bindet und auf diese Weise die rhythmische Expression von zirkadianen Regulatoren festlegt (Huang & Nusinow, 2016). Unter den identifizierten Zielgenen finden sich auch Gene des miR156-abhängigen autonomen Signalwegs, u. a. *MIR172A* und *MIR172B*. Die Analyse der *MIR172*-Expression im Tagesverlauf zeigt, dass pri-miR172b tatsächlich zirkadian reguliert wird: Pri-miR172b zeigt bei den unbehandelten Kontrollpflanzen einen Expressionsanstieg im Laufe des Tages und eine Verringerung in der Nacht (Abb. 40D). *MIR172D* und *MIR172E* zeigten im Tagesverlauf hingegen kaum Expressions-

änderungen (Abb. 40D). Die Abundanz der reifen miR172 änderte sich unter Kontrollbedingungen nicht im Tagesverlauf (Daten nicht gezeigt), was bestätigt, dass zwar einzelne *MIR172*-Gene zirkadian reguliert werden könnten, die reife miR172 allerdings nicht (Jung *et al.*, 2007).

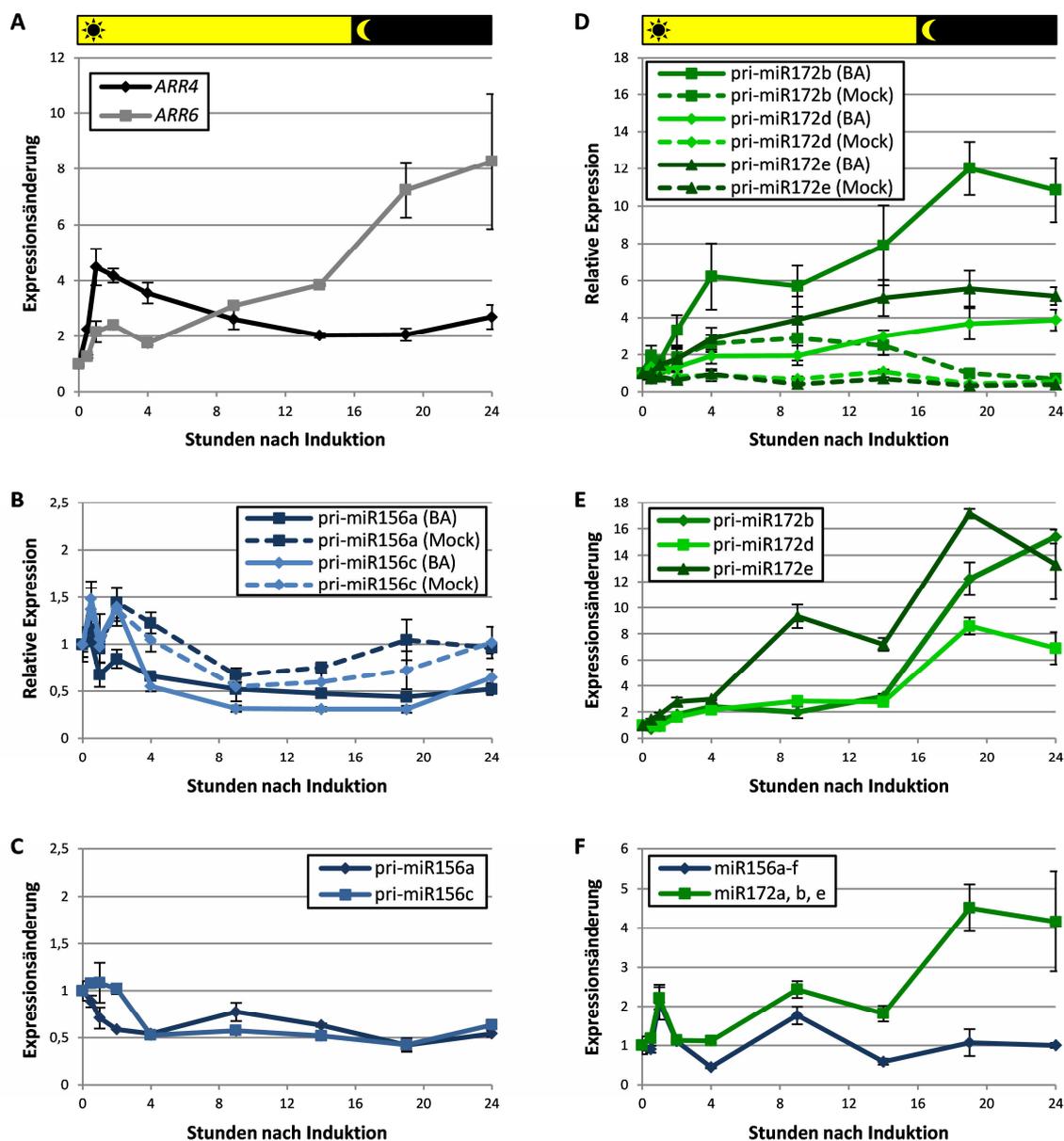


Abb. 40: Cytokinin induziert die Expression von miR172. Expressionsänderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bzw. Expressionslevel von (A) *ARR4*, *ARR6*, (B, C) pri-miR156a, pri-miR156c, (D, E) pri-miR172b, pri-miR172d und pri-miR172e und (F) der reifen miR156 und miR172 im Tagesverlauf; dargestellt sind relative Werte im Vergleich zum Expressionslevel zum Zeitpunkt 0, das auf 1 gesetzt wurde.

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. *Arabidopsis*-Keimlinge des Ökotyps Col-0 wurden zehn TNK zu Beginn der Lichtphase mit 1 μ M BA induziert; von diesem Zeitpunkt 0 aus wurden zu definierten Zeitpunkten ganze Keimlinge für die Expressionsanalyse geerntet. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4). (A-E) *PP2AA2* und *TAFII15* bzw. (F) *TAFII15* dienten als Referenzgene. BA = Benzyladenin; Mock = unbehandelte Proben.

Die Cytokininbehandlung führt bei den drei getesteten *MIR172*-Genen zu einem deutlichen Anstieg des Expressionslevels (Abb. 40D und Abb. 40E). Der Expressionsunterschied zur unbehandelten Kontrolle ist für pri-miR172b und pri-miR172d in der Nacht am höchsten, während sich die Abundanz von pri-miR172e bereits im Laufe des Tages erheblich vom gemessenen Normalwert abhebt (Abb. 40E). Für die reife miR172 konnte ebenfalls eine starke Zunahme der Expression zum Ende des Tages hin gemessen werden (Abb. 40F).

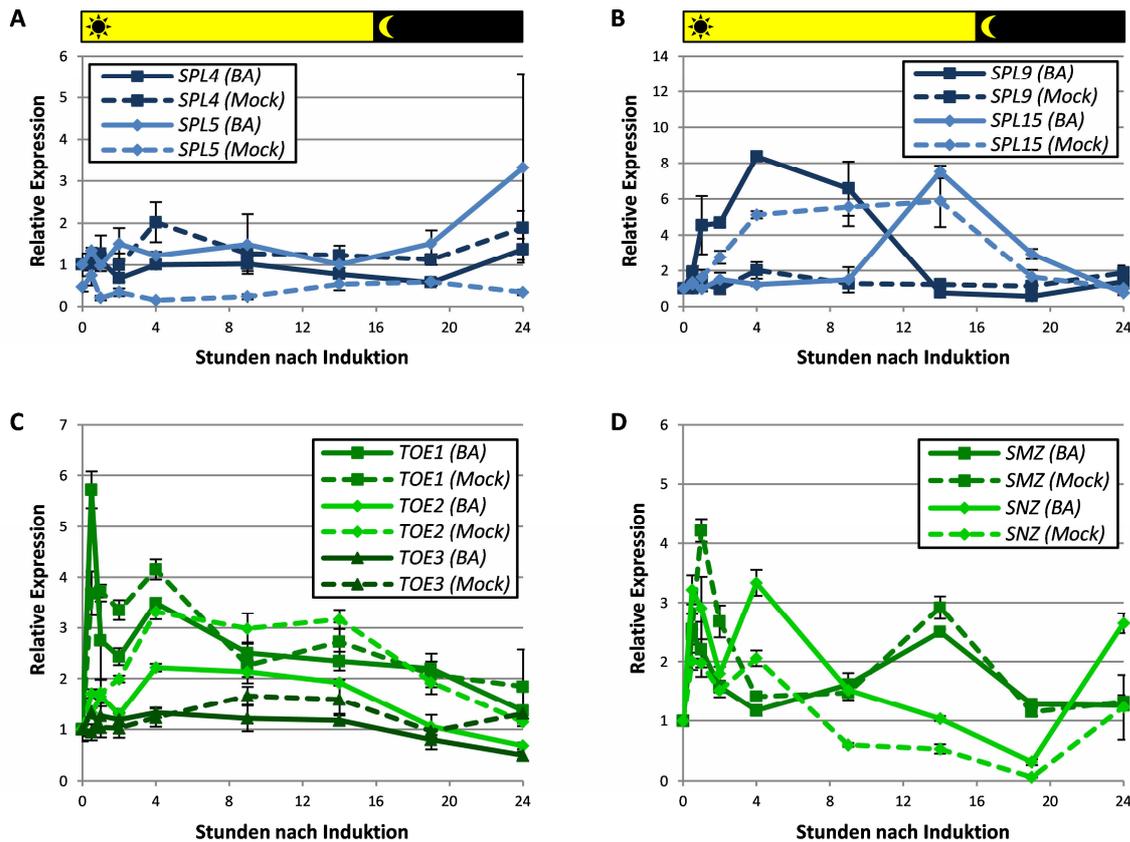


Abb. 41: Die Expression von miR156- und miR172-Zielgenen steht nicht unter direkter Cytokininkontrolle. Expressionslevel von (A) *SPL4*, *SPL5*, (B) *SPL9*, *SPL15*, (C) *TOE1*, *TOE2*, *TOE3*, (D) *SMZ* und *SNZ* im Tagesverlauf; dargestellt sind relative Werte im Vergleich zum Expressionslevel zum Zeitpunkt 0, das auf 1 gesetzt wurde. Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. *Arabidopsis*-Keimlinge des Ökotyps Col-0 wurden zehn TNK zu Beginn der Lichtphase mit 1 μ M BA induziert; von diesem Zeitpunkt 0 aus wurden zu definierten Zeitpunkten ganze Keimlinge für die Expressionsanalyse geerntet. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4). *PP2AA2* und *TAFII15* dienen als Referenzgene. BA = Benzyladenin; Mock = unbehandelte Proben.

Für *SPL4* und *TOE1* können keine starken Expressionsunterschiede zwischen cytokininbehandelten Keimlingen und Kontrollpflanzen festgestellt werden (Abb. 41A und Abb. 41C). Die Expression von *SPL5* zeigt unter Einfluss von Cytokinin einen zur Kontrolle gegensätzlichen Verlauf. Das *SPL5*-Level steigt in den ersten vier Stunden auf das Achtfache des Kontrollwertes an, vermindert sich zum Ende der Lichtperiode wieder etwas, um dann bis zum Ende der Nacht wieder auf das Zehnfache anzusteigen (Abb.

41A). Während sich die *SPL9*-Expression unter Kontrollbedingungen kaum verändert, sorgt der Cytokinineinfluss während der Lichtphase zu einer Zunahme der Transkriptmenge um das Fünffache im Vergleich zu den unbehandelten Proben (Abb. 41B). In der Dunkelphase ist hingegen kein Unterschied mehr zur Kontrolle messbar (Abb. 41B). Für *SPL15* kann ein Expressionsanstieg beobachtet werden, der im Kontrollexperiment deutlich früher erfolgt als im Cytokinin-Experiment (Abb. 41B).

Die *TOE2*-Transkriptabundanz zeigt einen zirkadianen Verlauf mit einer Zunahme während der Lichtphase, die Amplitude fällt aber in cytokininbehandelten Keimlingen durchweg niedriger aus (Abb. 41C). Auch *SMZ* zeigt einen diurnalen Verlauf der Expression mit einem Maximum 60 Minuten nach Beginn der Lichtphase und einem weiteren nach 14 Stunden. Die Cytokininapplikation hat zur Folge, dass die *SMZ*-Transkriptmenge bereits nach 30 Minuten wieder abfällt und das erste Maximum des Kontroll-experiments nicht erreicht wird (Abb. 41D). Das Expressionslevel von *TOE3* verändert sich nach Cytokiningabe im Experimentverlauf kaum, nur am Ende der Nachtphase ist ein Abfall auf unter die Hälfte des Kontrollwertes zu beobachten (Abb. 41C). Die Transkriptmenge von *SNZ* nimmt im Laufe des Tages kontinuierlich ab, mit dem geringsten Wert zum Beginn der Nachtphase, um danach auf den Ausgangswert zurückzukehren (Abb. 41D). Das *SNZ*-Expressionslevel ist in cytokininbehandelten Pflanzen dabei stets höher als in den Kontrollproben (Abb. 41D).

3.2.6. *ARR1*, *ARR2* und *ARR12* binden in einem *Yeast-one-hybrid*-Matrixansatz an *MIR172*-Promotoren

Während die Zielgene von miR156 und miR172 nicht unter direkter Kontrolle von Cytokinin zu stehen scheinen, zeigte sich ein sehr deutlicher Einfluss auf die Transkription der *MIR172*-Gene (Abb. 40D und Abb. 40E). Um die Möglichkeit einer direkten Bindung von Typ-B-ARRs an die Promotoren der *MIR172*-Gene zu testen, wurde zunächst eine Promotoranalyse durchgeführt. In den Promotoren cytokinin-regulierter Gene (z. B. Typ-A-ARRs, *CKX*-Gene) wurden verschiedene *cis*-Elemente entdeckt, an welche Typ-B-ARRs binden könnten, um die Genaktivität zu regulieren (Brenner *et al.*, 2012). Am besten untersucht ist das *Cytokinin Response Motif* (CRM) 5'-[A,G]GAT[T,C]-3' bzw. das erweiterte CRM (ECRM) 5'-AAGAT[T,C]TT-3' (Sakai *et al.*, 2000; 2001; Hosoda *et al.*, 2002; Imamura *et al.*, 2003; Taniguchi *et al.*, 2007; Ramireddy *et al.*, 2013). Für die Überprüfung auf das Vorhandensein von CR- und ECR-Motiven in den *MIR172*-Promotoren wurden 2 kb der intergenischen Sequenzen 5'-wärts des jeweiligen annotierten Transkriptionsstarts verwendet. Im Fall von *pMIR172E* wurde der gesamte Sequenzbereich zwischen Startcodon des *MIR172E*-Gens und dem Stoppcodon des nächsten, in 5'-Richtung befindlichen Gens verwendet.

In den ersten 220 bp 5'-wärts des Startcodons von *ARR6* befinden sich zwei ECR-Motive (Abb. 42) (Ramireddy *et al.*, 2013). In den regulatorischen Sequenzregionen von *MIR172A* und *MIR172C* kann

neben mehreren CR-Motiven das ECRM zweimal bzw. einmal nachgewiesen werden (Abb. 42). Die intergenischen Sequenzen von *MIR172B* und *MIR172E* enthalten nur das einfache Bindemotiv (Abb. 42). Der proximale Promotorbereich von *MIR172D* verfügt nur über CR-Motive (Abb. 42), erst 2319 bp 5'-wärts des Transkriptionsstarts findet sich ein ECRM.

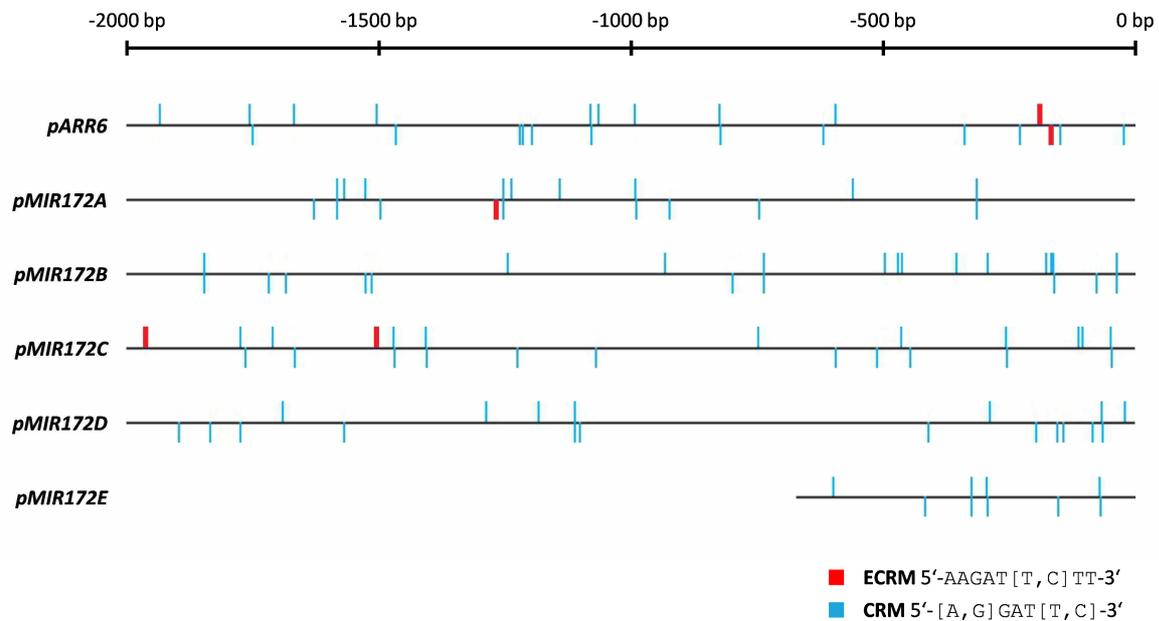


Abb. 42: Überprüfung auf das Vorhandensein des *Cytokinin Response Motif* (CRM) bzw. des erweiterten CRM (ECRM) in den proximalen Promotoren der *MIR172*-Gene. Für die Analyse wurden 2 kb der intergenischen Sequenzen 5'-wärts des jeweiligen annotierten Transkriptionsstarts verwendet. Die Motivsuche wurde mithilfe der TOUCAN3-Software (Aerts *et al.*, 2005) durchgeführt.

Um die Bindung von Typ-B-ARRs an *MIR172*-Promotoren zu testen, wurde ein *Yeast-one-hybrid*-Matrixansatz durchgeführt. Dafür wurden 2293 bp, 2010 bp bzw. 839 bp 5'-wärts des Startcodons der Gene *MIR172B*, *MIR172D* bzw. *MIR172E* amplifiziert. Es wurden diese Gene ausgewählt, da sie bereits in den Genexpressionsanalysen eine cytokininabhängige Aktivität zeigten. Da sich die Amplifizierung eines *pMIR172D*-Fragments inklusive des ECRM als schwierig erwies, wurde ein kürzeres Fragment ohne dieses Motiv kloniert. Die Promotorfragmente wurden in den *Yeast-one-hybrid*-Reportervektor pHISi-1-GW (Alexandre *et al.*, 1993; Pfeifer, 2012) kloniert und über homologe Rekombination in das Genom des Hefestammes L40ccua integriert. Die erfolgreiche Integration der Promotorfragmente ins Hefegenom wurde mittels Kolonie-PCR bestätigt (Abb. 43A). Als Positivkontrolle für den Interaktionstest wurde das 220 bp-Fragment des *ARR6*-Promotors (Ramireddy *et al.*, 2013) verwendet. Als Negativkontrolle fungierte der Leervektor. Da der pHISi-1-GW-Vektor nicht in Hefezellen repliziert werden kann, ist das Wachstum des verwendeten Hefestammes nur nach erfolgreicher Integration des Reporterkonstrukts mit funktionalem *HIS3*-Gen auf SD-Medium ohne Histidin (His) möglich.

Die Hefe-Reporterstämme wurden anschließend mit pACT2-Plasmiden transformiert, welche Fusionen der Typ-B-ARRs ARR1, ARR2, ARR10, ARR11, ARR12, ARR14 und ARR18 mit der GAL4-Aktivierungsdomäne unter der Kontrolle des konstitutiven *ADH1*-Promotors exprimieren. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor ohne eine für ein Protein kodierende Sequenz verwendet. Der pACT2-Vektor enthält ein *LEU2*-Gen, das den auxotrophen Hefestamm befähigt auf SD-Medium ohne Zugabe der Aminosäure Leucin (Leu) zu wachsen.

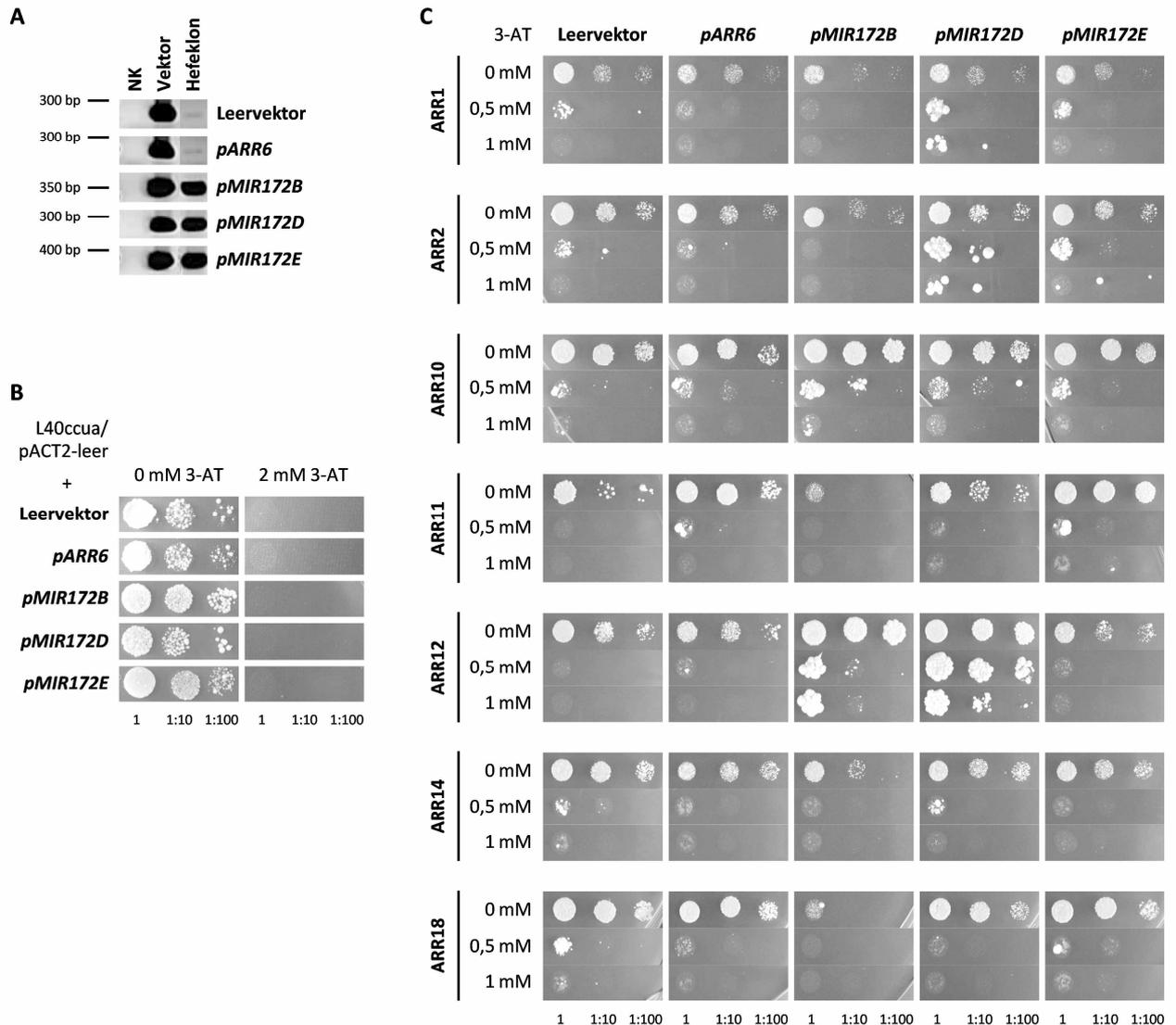


Abb. 43: Typ-B-ARRs interagieren in einem Yeast-one-hybrid-Matrixansatz mit MIR172-Promotorfragmente. (A) Verifizierung der Integration der Reporterkonstrukte mit den verwendeten Promotorfragmenten ins Hefegenom; Ergebnis der Kolonie-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für die jeweiligen Promotoren und die Leerkontrolle. (B) Die *HIS3*-Grundaktivität in Hefeklonen mit integriertem Reporterkonstrukt und pACT2-leer wird bereits bei Zugabe von 2 mM 3-AT ins Medium (SD/-His/-Leu) unterdrückt. (C) Test auf Interaktion verschiedener Typ-B-ARRs mit den verwendeten Promotorfragmenten auf SD/-His/-Leu mit 0 mM, 0,5 mM und 1 mM 3-AT. Vergleichbare Hefemengen wurden in 200 µl SD-Medium resuspendiert, in drei Verdünnungsstufen (1, 1:10 und 1:100) zu je 10 µl auf SD/-His/-Leu getropft und für sechs bzw. 16 Tage bei 30 °C inkubiert. NK = Negativkontrolle.

Das *HIS3*-Gen in pHISi-1-GW steht unter der Kontrolle eines Minimalpromotors, um eine schwache Expression des Gens und damit das Wachstum auf histidinfreiem Medium nach erfolgreicher Integration ins Hefegenom zu gewährleisten. Um diese Hintergrundexpression im Interaktionstest zu unterdrücken, wurde 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT), ein Kompetitor der Histidinbiosynthese, ins Medium gegeben. Um die geeignete 3-AT-Konzentration für den Interaktionstest zu bestimmen, wurden die Hefe-Reporterstämme mit dem pACT2-Leervektor auf SD-Medium ohne Histidin und Leucin und mit verschiedenen 3-AT-Konzentrationen (0 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM) getropft. Wie in Abb. 43B gezeigt, führen bereits 2 mM 3-AT zu einer vollständigen Unterdrückung der *HIS3*-Hintergrundexpression.

Für den eigentlichen Interaktionstest der Typ-B-ARRs mit den Promotorfragmenten der *MIR172*-Gene wurden die Hefetransformanten auf SD/-His/-Leu mit 0 mM, 1 mM und 2 mM 3-AT getropft. Da nach sechs Tagen noch kein Wachstum auf 3-AT-haltigem Medium sichtbar war (Daten nicht gezeigt), wurde der Test auf SD/-His/-Leu mit 0 mM, 0,5 mM und 1 mM 3-AT wiederholt. Da erneut nach sechs Tagen kein Hefewachstum auf 3-AT-haltigem Medium zu erkennen war, wurden die Platten für weitere zehn Tage inkubiert und zeigten schließlich Wachstum (Abb. 43C).

Während bei einer Konzentration von 0,5 mM 3-AT die meisten Negativkontrollen noch wachsen können, ist bei 1 mM kaum noch Wachstum erkennbar (Abb. 43C). Das 220 bp-Promotorfragment von *pARR6* stellte sich als schlechte Positivkontrolle heraus, da keine Interaktion zwischen Typ-B-ARRs und *pARR6* nachgewiesen werden kann, was sich aber mit Ergebnissen anderer Hefe-Experimente deckt (Pfeifer, 2012). Dieses Ergebnis zeigt aber, dass das Vorhandensein von ECR-Motiven nicht zwangsläufig eine DNA-Bindung von Typ-B-ARRs im Hefesystem gewährleistet.

Für *pMIR172B* konnte eine Interaktion mit ARR12 gezeigt werden; die *pMIR172B/ARR12*-Transformanten zeigen bei 1 mM 3-AT noch sehr starkes Wachstum (Abb. 43C). Im durchgeführten *Yeast-one-hybrid*-Ansatz ist außerdem eine Interaktion von ARR1, ARR2 und ARR12 mit *pMIR172D* zu beobachten (Abb. 43C). Für *pMIR172E* ist keine *HIS3*-Aktivierung durch Typ-B-ARRs nachweisbar (Abb. 43C).

3.2.7. Genetische Untersuchung der Interaktion der Cytokinin-Signalkaskade mit dem miR156-abhängigen autonomen Signalweg

Die bisherigen Ergebnisse machen vor allem einen positiven Einfluss von Cytokinin auf die Expression der *MIR172*-Gene und der reifen miR172 deutlich, aber auch die Aktivität mehrerer *MIR156*-Gene wird durch das Phytohormon beeinflusst, obgleich sich dies nicht auf die Abundanz der reifen miR156 auswirkt. Auch wenn für die Transkriptabundanzen der Zielgene kein direkter Cytokinineinfluss nachgewiesen werden konnte, so ist aufgrund der komplexen *Feedback*-Regulationen innerhalb des miR156-abhängigen autonomen Signalwegs ein solcher dennoch nicht ausgeschlossen. Außerdem gilt es die Frage zu beantworten, ob die Cytokininsignalkaskade eher parallel zur miR156 agiert oder vielleicht

sogar epistatisch oberhalb der miR156 einzuordnen ist. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden *rock2* und *ahk2 ahk3* mit verschiedenen transgenen Linien und Mutanten des miR156/miR172-Signalwegs gekreuzt, homozygote Linien generiert und diese hinsichtlich ihrer Entwicklungsphasen und -übergänge untersucht. Dabei zeigten sich auch andere Einflüsse der Rezeptormutanten, wie z. B. auf den Rosetten-durchmesser, die hier aber nicht weiter analysiert werden. Die Kreuzungen werden nachfolgend im Einzelnen vorgestellt.

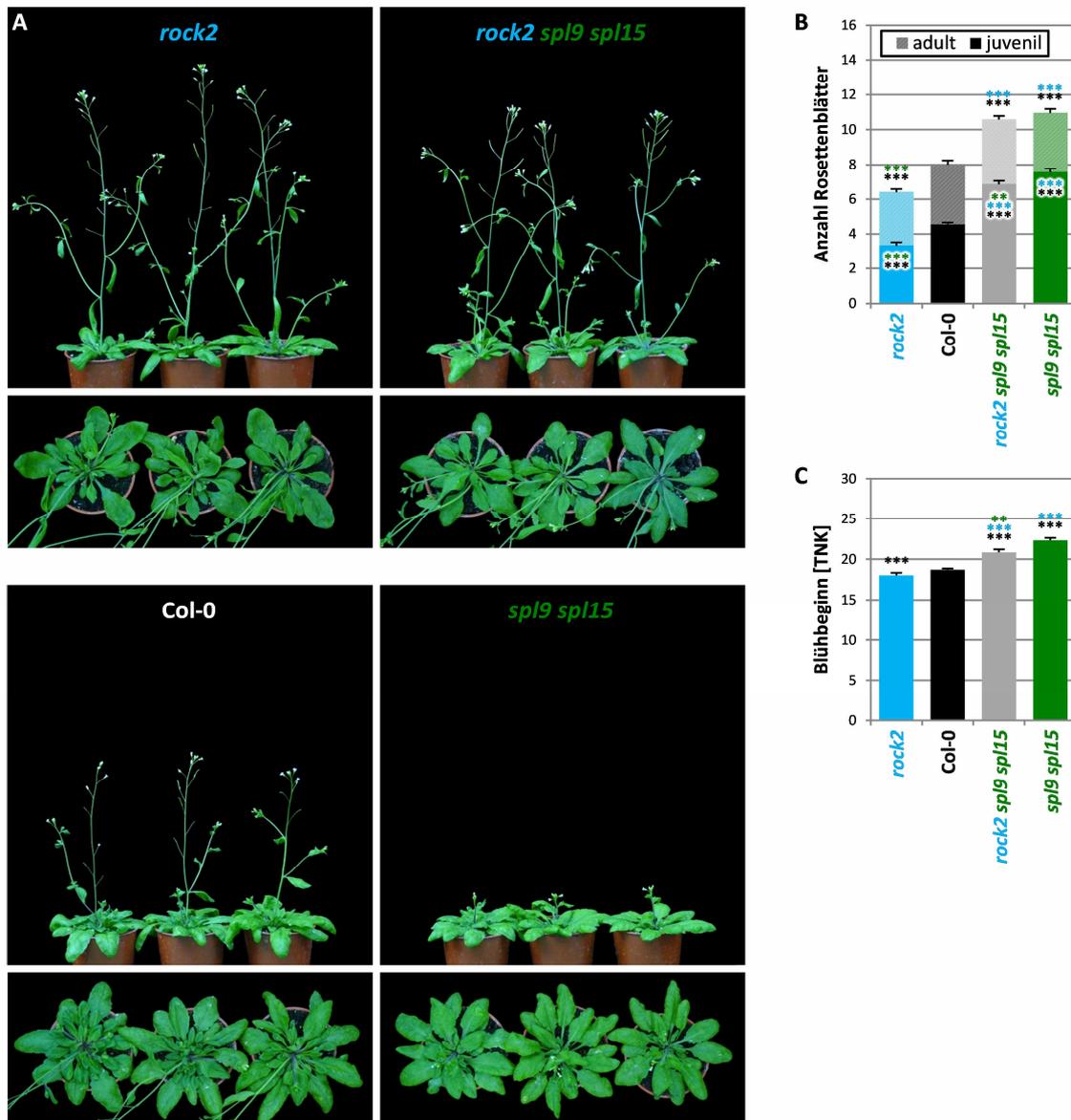


Abb. 44: Die *rock2*-Mutation revertiert partiell die verlängerte juvenile Phase und den verspäteten Blühbeginn der *spl9 spl15*-Doppelmutante. (A) Phänotyp von *rock2 spl9 spl15* im Vergleich zu *rock2*, Col-0 und *spl9 spl15* (28 TNK); (B) Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter; (C) Blühzeitpunkt (TNK).

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((B) n = 15; (C) n = 22-24); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, bezogen auf *rock2* (blau), Wildtyp (schwarz) und *spl9 spl15* (grün) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Die *spl9 spl15*-Doppelmutante produziert insgesamt mehr Rosettenblätter im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 44A und Abb. 44B), was auf drei zusätzliche juvenile Blätter zurückzuführen ist (Abb. 44B). *Rock2*-Pflanzen bilden durchschnittlich 1,2 juvenile Blätter weniger als der Wildtyp (Abb. 44B). Die juvenile Phase von *rock2 spl9 spl15* ist länger als bei Wildtyp-Pflanzen. Die Dreifachmutante produziert etwa $6,9 \pm 0,2$ juvenile Blätter. Die juvenile Phase ist damit kürzer als bei *spl9 spl15* (Abb. 44B). Die Gesamtblätterzahlen von *rock2 spl9 spl15* und *spl9 spl15* sind sich hingegen sehr ähnlich (Abb. 44B).

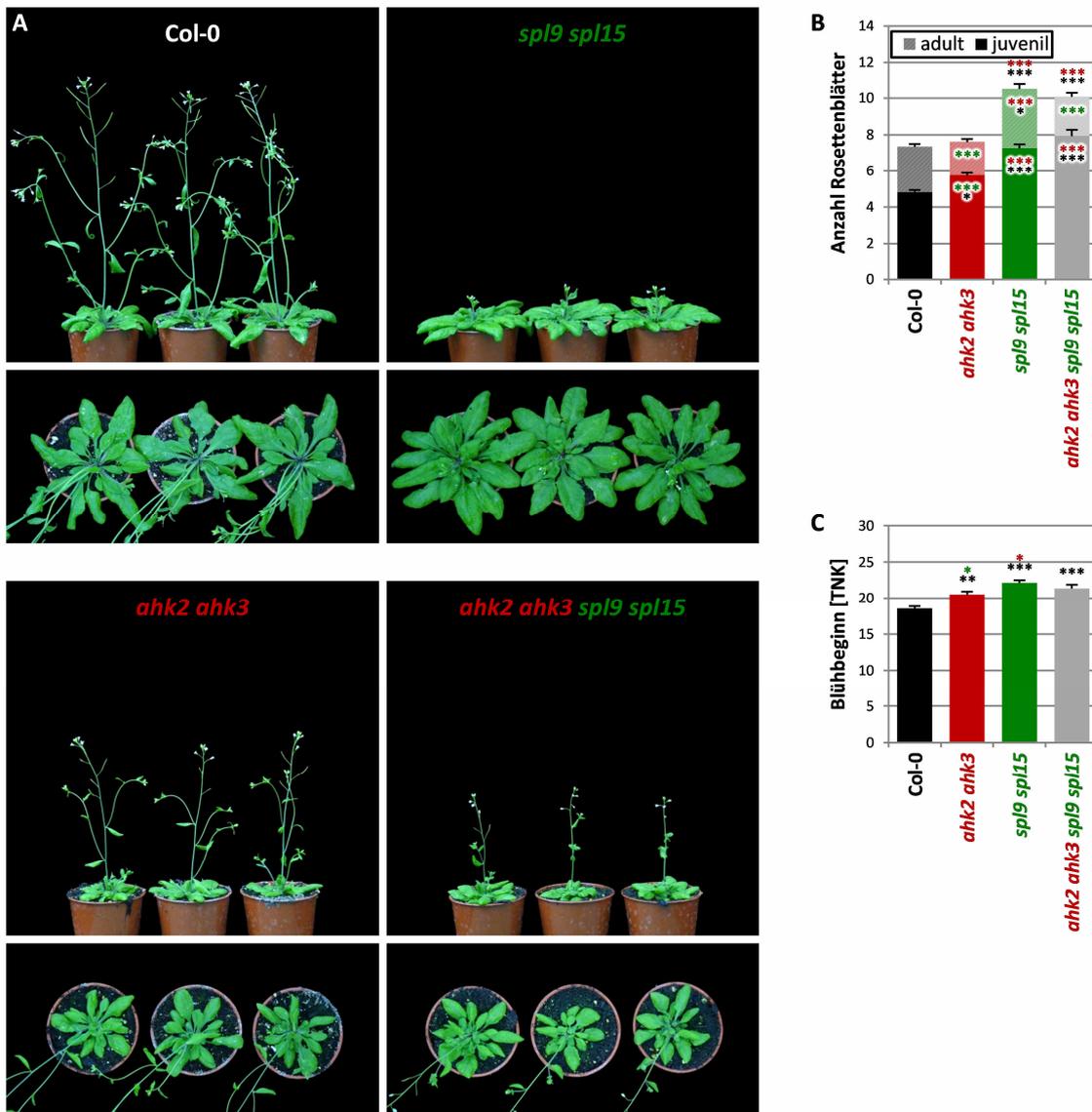


Abb. 45: Der Verlust von AHK2 und AHK3 führt zu einer zusätzlichen Verlängerung der juvenilen Phase von *spl9 spl15*, während sich die adulte Phase verkürzt. **(A)** Phänotyp von *ahk2 ahk3 spl9 spl15* im Vergleich zu Col-0, *ahk2 ahk3* und *spl9 spl15* (28 TNK); **(B)** Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter; **(C)** Blühzeitpunkt (TNK). Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (**(B)** n = 15; **(C)** n = 23-24); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, bezogen auf Wildtyp (schwarz), *ahk2 ahk3* (rot) und *spl9 spl15* (grün) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Rock2 blüht früher als der Wildtyp, *sp19 sp15* deutlich später (Abb. 44A und Abb. 44C). Die Kombination der drei Mutationen hat einen Blühzeitpunkt zur Folge, der zwischen Wildtyp und *sp19 sp15* liegt und signifikant unterschiedlich zu beiden ist (Abb. 44A und Abb. 44C).

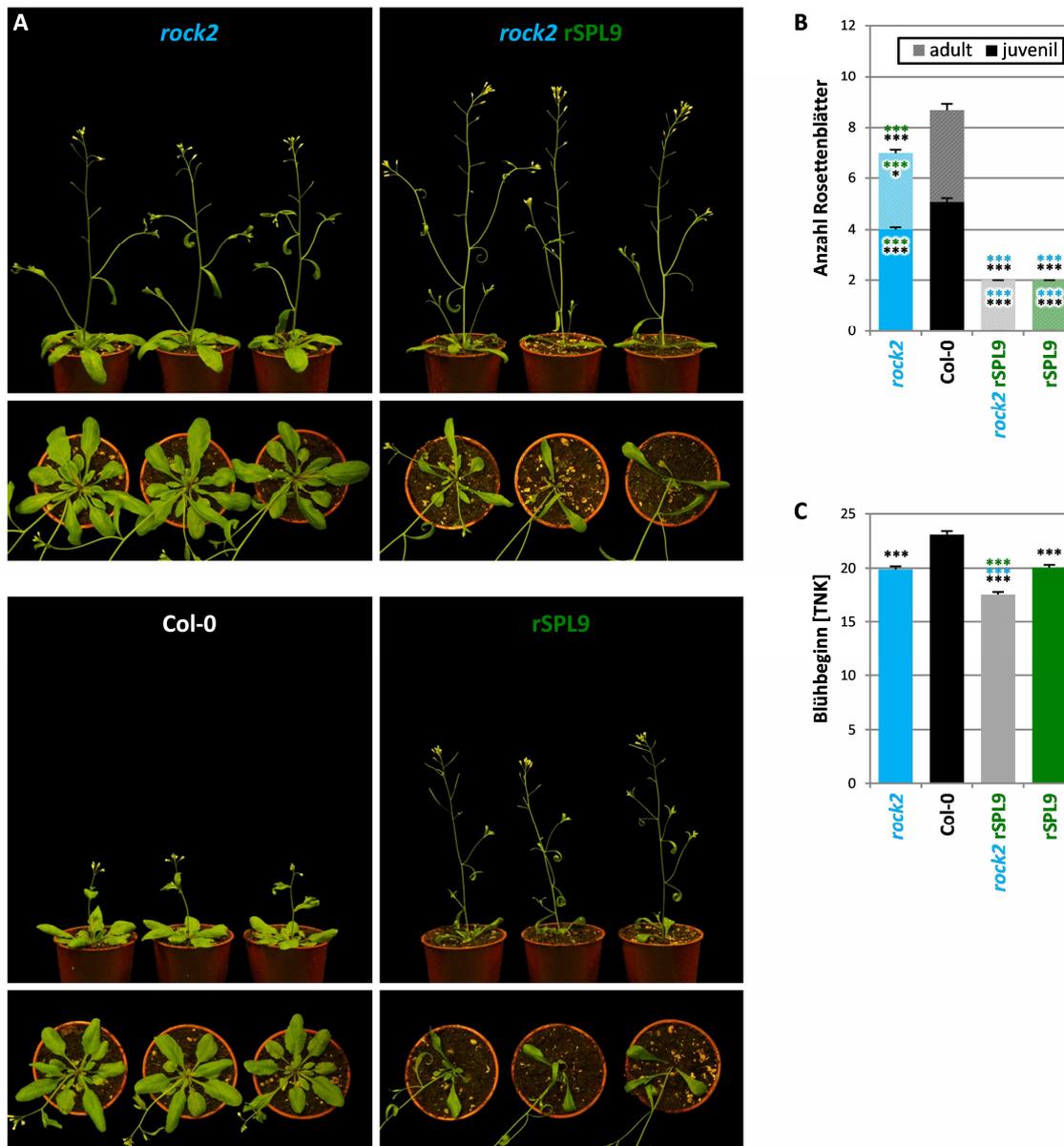


Abb. 46: *Rock2 rSPL9* ähnelt *rSPL9*, blüht aber früher. (A) Phänotyp von *rock2 rSPL9* im Vergleich zu *rock2*, Col-0 und *rSPL9* (28 TNK); **(B)** Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter; **(C)** Blühzeitpunkt (TNK).

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((**B**) $n = 15$; (**C**) $n = 23-24$); * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$, bezogen auf *rock2* (blau), Wildtyp (schwarz) und *rSPL9* (grün) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Die *ahk2 ahk3*-Doppelmutante produziert insgesamt vergleichbar viele Rosettenblätter wie der Wildtyp (Abb. 45A und Abb. 45B, s. auch Abb. 30A), wobei der Übergang zur adulten Phase verzögert ist (Abb. 45B). Mit $5,7 \pm 0,2$ juvenilen Rosettenblättern ist die juvenile Phase von *ahk2 ahk3* länger als die des

Wildtyps und kürzer als die der *spl9 spl15*-Doppelmutante (Abb. 45B). Die Vierfachmutante *ahk2 ahk3 spl9 spl15* bildet mit durchschnittlich $7,9 \pm 0,3$ die meisten juvenilen Rosettenblätter, was sich statistisch allerdings nicht von der juvenilen Blätterzahl der *spl9 spl15*-Doppelmutante unterscheidet (Abb. 45B). Interessanterweise ist die adulte Phase der Vierfachmutante im Vergleich zu Col-0 und *spl9 spl15* verkürzt und ähnelt damit stark derjenigen der *ah2 ahk3*-Doppelmutante (Abb. 45B). Beide Doppelmutanten beginnen später zu blühen als der Wildtyp (Abb. 45C). Der Blühbeginn der Quadrupelmutante erfolgt etwa zeitgleich mit *spl9 spl15* und *ahk2 ahk3* (Abb. 45C).

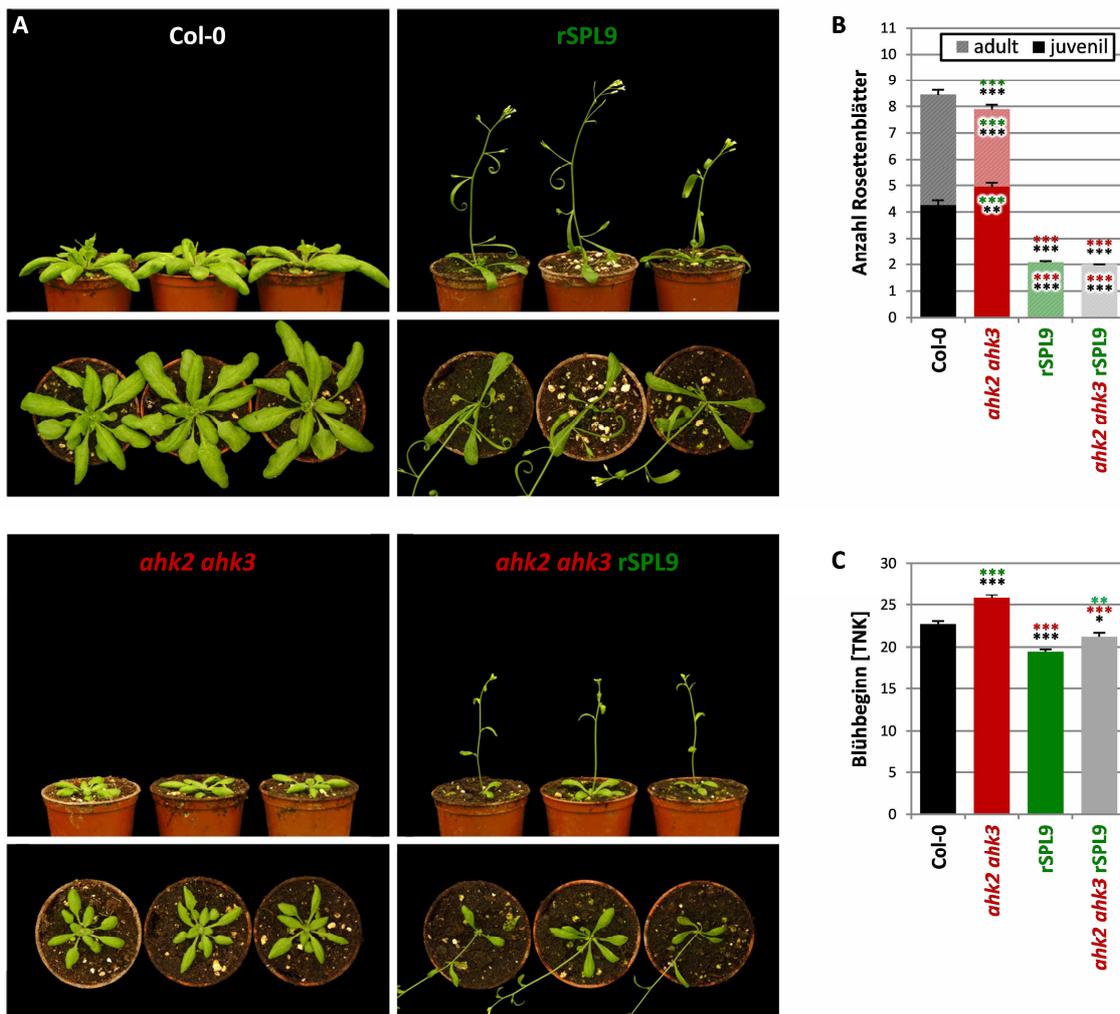


Abb. 47: *Ahk2 ahk3 rSPL9* ähnelt *rSPL9*, blüht aber später. (A) Phänotyp von *ahk2 ahk3 rSPL9* im Vergleich zu Col-0, *ahk2 ahk3* und *rSPL9* (24 TNK); (B) Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter; (C) Blühzeitpunkt (TNK). Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen; Fotos und Datenerhebung: Jutta Hoffmann. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((B) n = 15-17; (C) n = 22-28); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, bezogen auf Wildtyp (schwarz), *ahk2 ahk3* (rot) und *rSPL9* (grün) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Zusammenfassend lässt sich beobachten, dass der konstitutiv aktive *rock2*-Rezeptor in der Lage ist, die verlängerte juvenile Phase und den verspäteten Blühbeginn der *spl9 spl15*-Doppelmutante partiell zu

revertieren, ohne aber Wildtypniveau zu erreichen. Der Verlust der Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 in der *spl9 spl15*-Doppelmutante führt zu einer weiteren, wenn auch geringfügigen, Verlängerung der juvenilen Phase, während die adulte Phase wie in der *ahk2 ahk3*-Doppelmutante verkürzt wird.

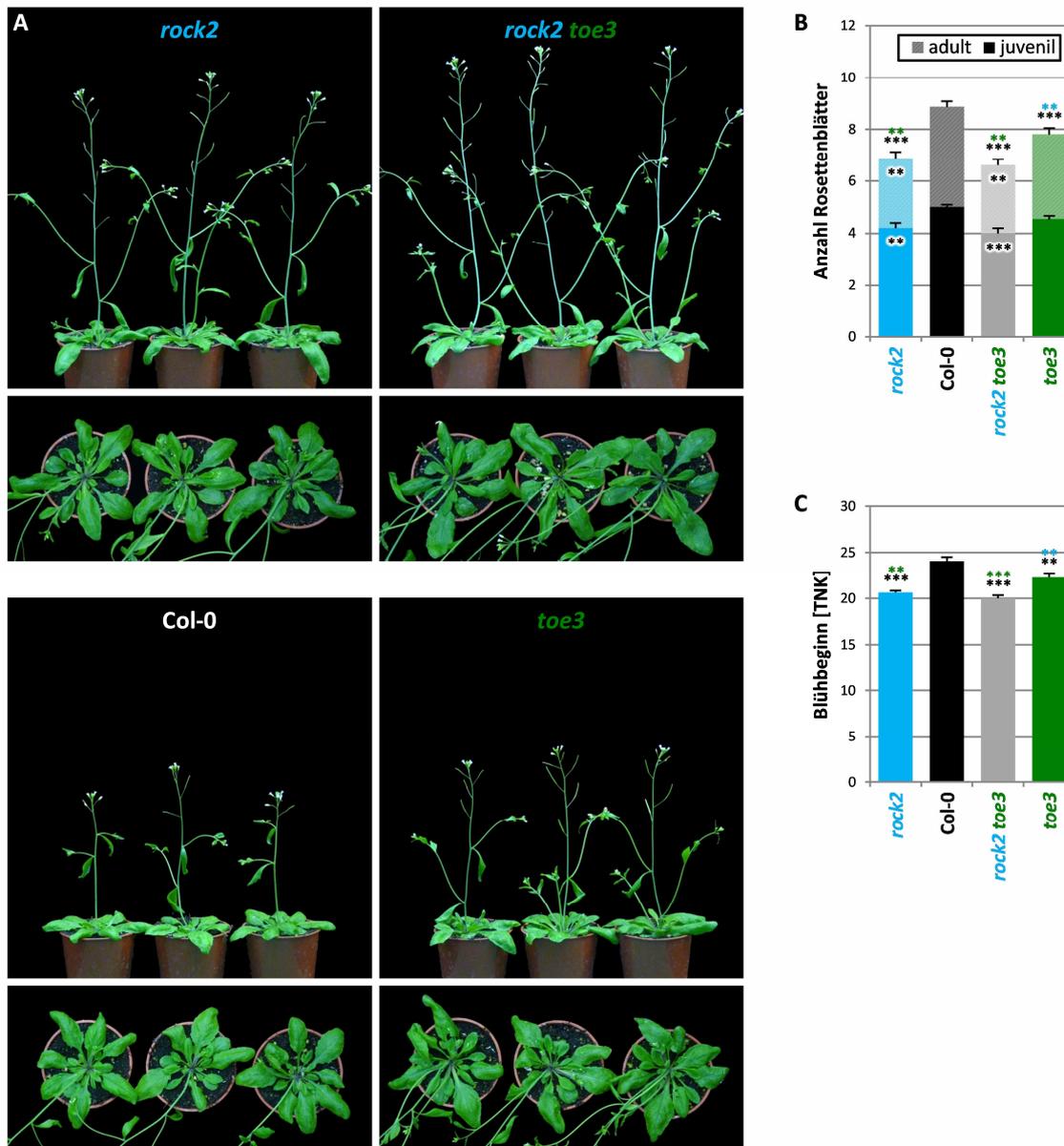


Abb. 48: Rock2 toe3 hat eine verkürzte Juvenil- und Adultphase, blüht früher und ähnelt dabei rock2-Pflanzen. (A) Phänotyp von *rock2 toe3* im Vergleich zu *rock2*, Col-0 und *toe3* (28 TNK); **(B)** Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter; **(C)** Blühzeitpunkt (TNK).

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((**B**) $n = 15$; (**C**) $n = 22-24$); $** = p < 0,01$, $*** = p < 0,001$, bezogen auf *rock2* (blau), Wildtyp (schwarz) und *toe3* (grün) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Die transgene Linie pSPL9:GFP-rSPL9 (rSPL9) exprimiert eine miR156-resistente Form von *SPL9*, was zur Folge hat, dass die juvenile Phase ausgelassen und die Pflanzen nach Bildung zweier adulter Blätter

sofort zu blühen beginnen (Abb. 46A, Abb. 46B, Abb. 47A und Abb. 47B) (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Der drastische Entwicklungsphasendimorphismus wird weder durch das Einkreuzen der *rock2*-Mutation noch von *ahk2 ahk3* beeinflusst (Abb. 46A, Abb. 46B, Abb. 47A und Abb. 47B). Die Rezeptormutationen beeinflussen allerdings das Blühverhalten: *rock2* rSPL9 blüht früher, *ahk2 ahk3* rSPL9 später als rSPL9 (Abb. 46A, Abb. 46C, Abb. 47A und Abb. 47C).

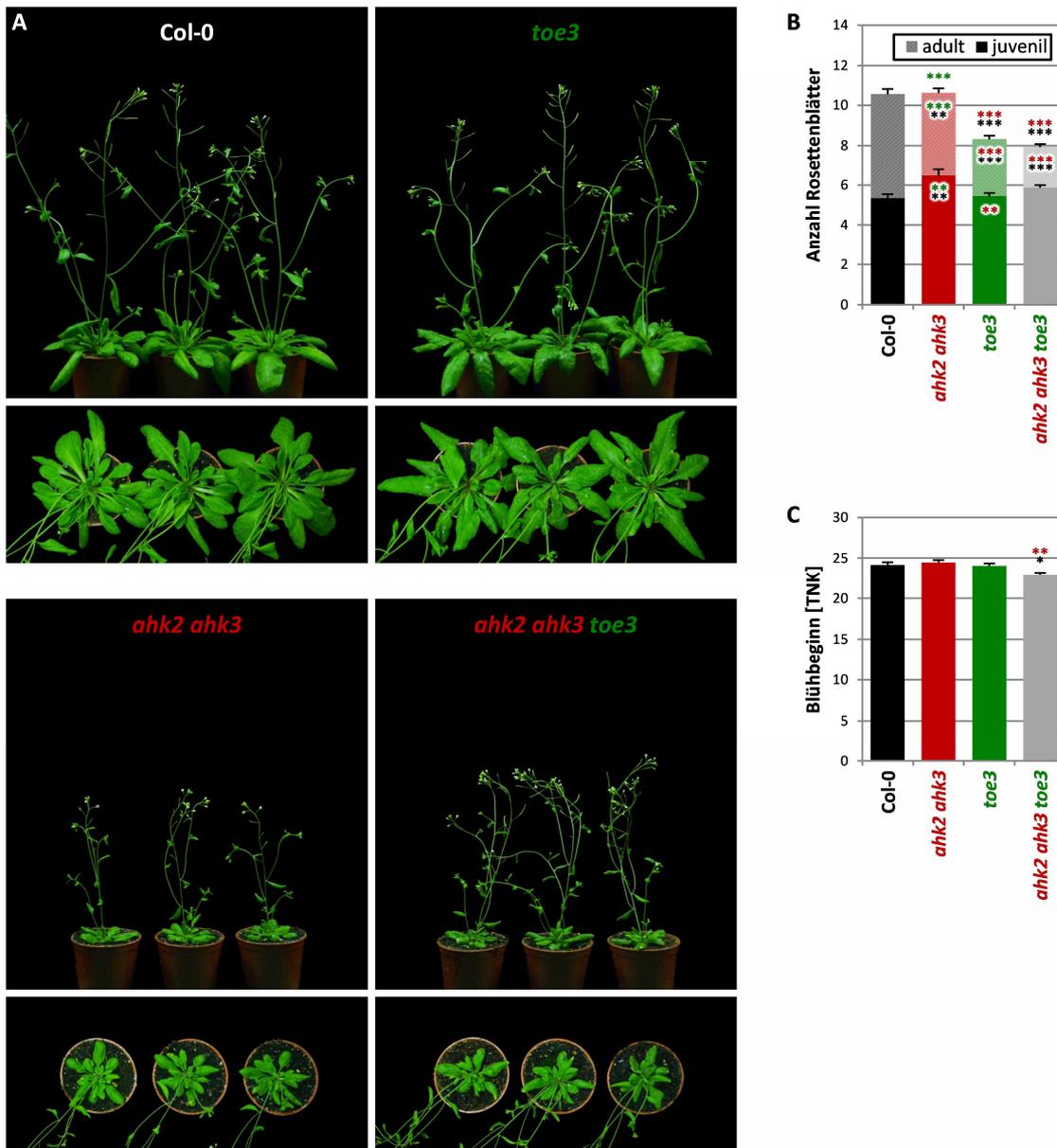


Abb. 49: *Ahk2 ahk3 toe3* ähnelt hinsichtlich der Juvenil- und der Adultphase sowie des Blühzeitpunktes am ehesten der *toe3*-Mutante. (A) Phänotyp von *ahk2 ahk3 toe3* im Vergleich zu Col-0, *ahk2 ahk3* und *toe3* (33 TNK); (B) Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter; (C) Blühzeitpunkt (TNK).

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((B) $n = 15$; (C) $n = 28$); * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, bezogen auf Wildtyp (schwarz), *ahk2 ahk3* (rot) und *toe3* (grün) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Bisher publizierte Daten zeigen, dass die hier verwendete *TOE3*-Mutante keinen Blühphänotyp besitzt (Jung *et al.*, 2014). In einem von zwei durchgeführten Experimenten (Abb. 48 und Abb. 49) konnte jedoch ein frühzeitiger Übergang zur reproduktiven Phase festgestellt werden, was aus leicht verkürzten Juvenil- und Adultphasen im Vergleich zur Wildtypkontrolle resultiert (Abb. 48). Auch bei *rock2 toe3*-Pflanzen sind diese Phasen mit $4,5 \pm 0,1$ juvenilen und $3,3 \pm 0,2$ adulten Rosettenblätter kürzer als beim Wildtyp, wodurch sie sehr stark den *rock2*-Pflanzen ähneln (Abb. 48B). Dementsprechend blüht *rock2 toe3* auch ähnlich früh wie *rock2*-Pflanzen (Abb. 48C).

Ahk2 ahk3 toe3-Pflanzen bilden insgesamt $7,9 \pm 0,1$ Blätter und damit fast so viele wie *toe3* (Abb. 49A, Abb. 49B). Col-0 und *ahk2 ahk3* produzieren $10,5 \pm 0,2$ bzw. $10,6 \pm 0,4$ Blätter (Abb. 49A, Abb. 49B). Konsistent mit vergleichbaren Analysen ist bei der *ahk2 ahk3*-Doppelmutante erneut eine verlängerte juvenile und eine verkürzte adulte Phase festzustellen (Abb. 49B). Bei der Länge der juvenilen Phase von *toe3* ist kein Unterschied zum Wildtyp erkennbar, während die Adultphase verglichen mit Col-0 und *ahk2 ahk3* sehr viel kürzer ausfällt (Abb. 49B). Die Anzahl der juvenilen Blätter bei *ahk2 ahk3 toe3*-Pflanzen zeigt keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolllinien, da der Wert von $5,9 \pm 0,1$ zwischen dem der *ahk2 ahk3*-Doppelmutante ($6,5 \pm 0,3$) und dem des Wildtyps und der *toe3*-Mutante ($5,3 \pm 0,2$ bzw. $5,4 \pm 0,2$) liegt (Abb. 49B). Die Kontrolllinien zeigen kaum Unterschiede im Blühverhalten, während *ahk2 ahk3 toe3* etwas früher blüht (Abb. 49A, Abb. 49C). Insgesamt ähnelt *ahk2 ahk3 toe3* hinsichtlich der Juvenil- und der Adultphase sowie des Blühzeitpunktes am ehesten der *toe3*-Mutante.

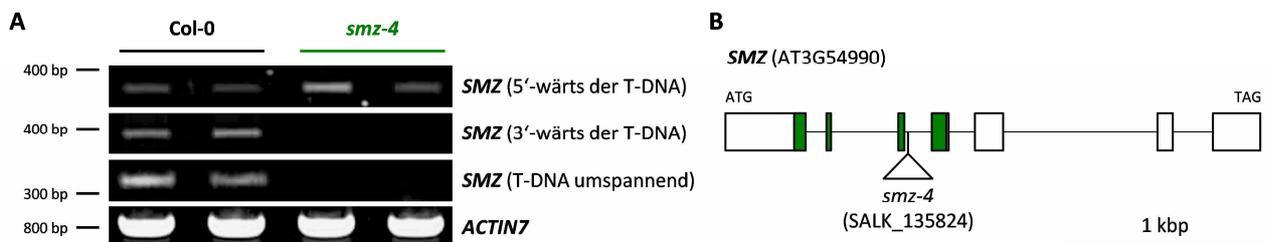


Abb. 50: Nachweis des SMZ-Genverlustes in einer bisher unbeschriebenen *smz*-Mutante. (A) Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCR mit 5'-wärts bzw. 3'-wärts der T-DNA bindenden Primerpaaren bzw. einem Primerpaar, das die T-DNA umspannt; für die Analyse wurde Blattmaterial von Col-0 und *smz-4* verwendet; Fotos: Jutta Hoffmann. **(B)** *SMZ*-Genstruktur mit Angabe der T-DNA-Insertion in der *smz-4*-Mutante; Exons sind als Boxen, Introns als Linie dargestellt; der für die AP2/ERF-DNA-Bindedomäne kodierende Bereich (Quelle: UniProtKB) ist grün dargestellt.

Für die Kreuzungen mit *rock2* und *ahk2 ahk3* wurde eine bisher nicht publizierte *SMZ-Knockout*-Mutante verwendet. Zur Überprüfung des Genausfalls wurde die Gesamt-RNA aus Blattmaterial von Col-0 und *smz-4* extrahiert, revers transkribiert und mit drei verschiedenen Primerpaaren getestet, ob cDNA-Fragmente 5'-wärts der T-DNA-Insertion, 3'-wärts der T-DNA-Insertion bzw. die T-DNA umspannend amplifiziert werden können. Nur 5'-wärts der T-DNA kann ein Amplifikat nachgewiesen werden (Abb. 50A), sodass davon ausgegangen werden kann, dass in der Mutante kein vollständiges *SMZ*-Transkript

gebildet wird. Darüber hinaus befindet sich die T-DNA-Insertion im dritten Intron des Gens und damit innerhalb der für die Funktion des Transkriptionsfaktors essenziellen AP2/ERF-DNA-Bindedomäne (Abb. 50B). Somit kann in der Mutante kein vollständig funktionales SMZ-Protein gebildet werden. Über die genauen Orte der T-DNA-Insertionen der bisher beschriebenen *SMZ-Knockout*-Mutanten *smz1* (Jung *et al.*, 2007) und *smz-1* und *smz-2* (Mathieu *et al.*, 2009) sind leider keine Informationen verfügbar, allerdings handelt es sich in diesen Fällen ebenfalls um Introninsertionen.

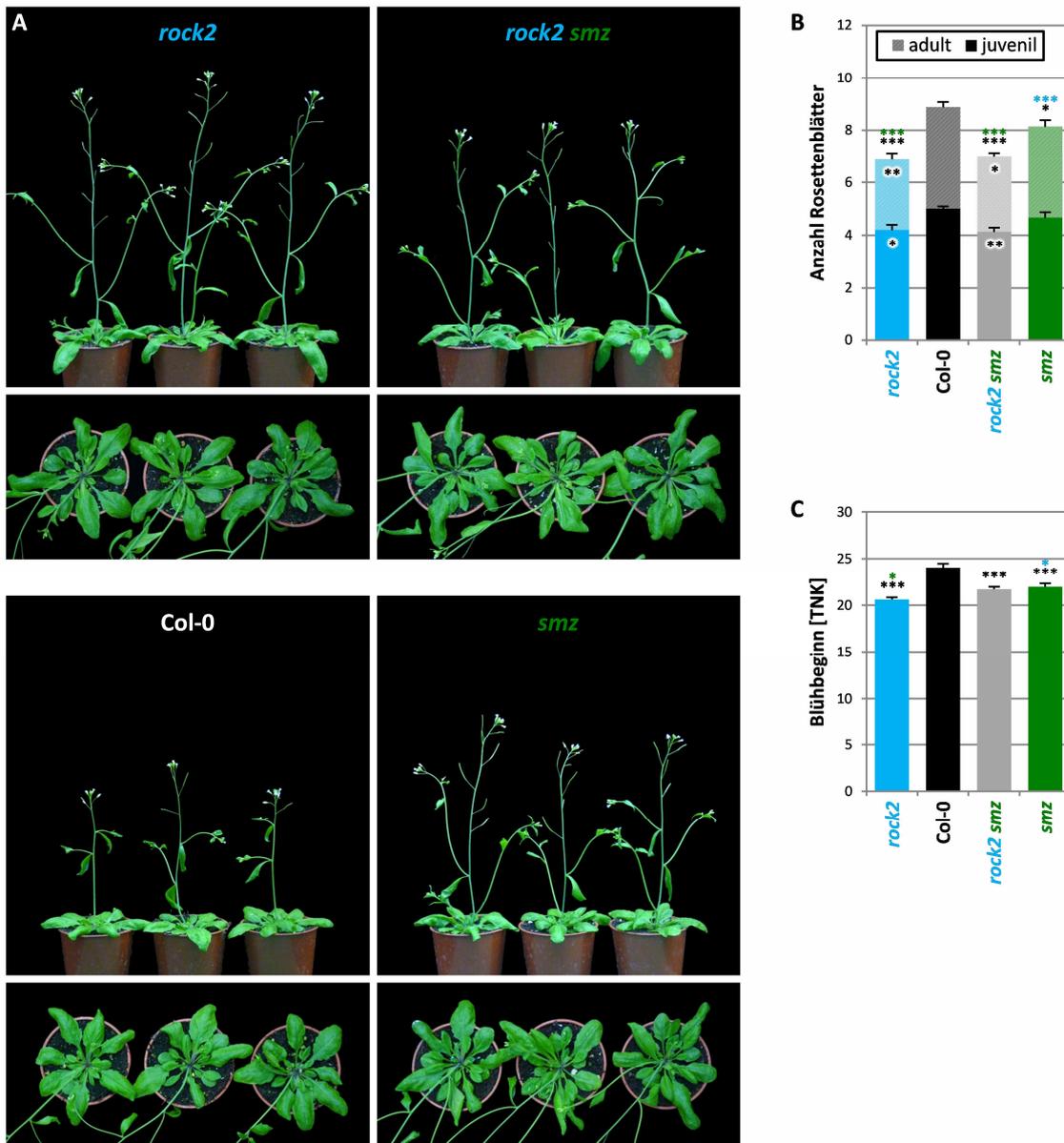


Abb. 51: Die Juvenil- und die Adultphase von *rock2 smz*-Pflanzen ist jeweils in ähnlicher Weise verkürzt wie bei *rock2*-Pflanzen. **(A)** Phänotyp von *rock2 smz* im Vergleich zu *rock2*, Col-0 und *smz* (28 TNK); **(B)** Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter; **(C)** Blühzeitpunkt (TNK).

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen; bei den Wildtyp- und *rock2*-Pflanzen handelt es sich um dieselben, die auch in Abb. 48 benutzt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((**A**) $n = 15$; (**B**) $n = 22-24$); * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, bezogen auf *rock2* (blau), Wildtyp (schwarz) und *smz* (grün) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Die Expressionsanalysen in Rosetten- und Einzelblattmaterial zeigten eine erhöhte Genaktivität von *SMZ* in cytokinindefizienten Pflanzen (Abschnitt 3.2.3), was eine Untersuchung von Kreuzungen von *smz-4* mit *rock2* und *ahk2 ahk3* besonders interessant macht. Die bisher beschriebenen *SMZ*-Mutanten zeigten kein von Wildtyp-Pflanzen unterschiedliches Blühverhalten (Jung *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2009). Die hier verwendete *smz-4*-Mutante (im weiteren Verlauf nur noch als *smz* bezeichnet) blüht hingegen zumindest in einem von zwei Experimenten (Abb. 51 und Abb. 52) früher als die Wildtypkontrolle (Abb. 51A und Abb. 51C). Die Juvenilphase von *smz* fällt im Vergleich zum Wildtyp kürzer aus (Abb. 51B und Abb. 52B).

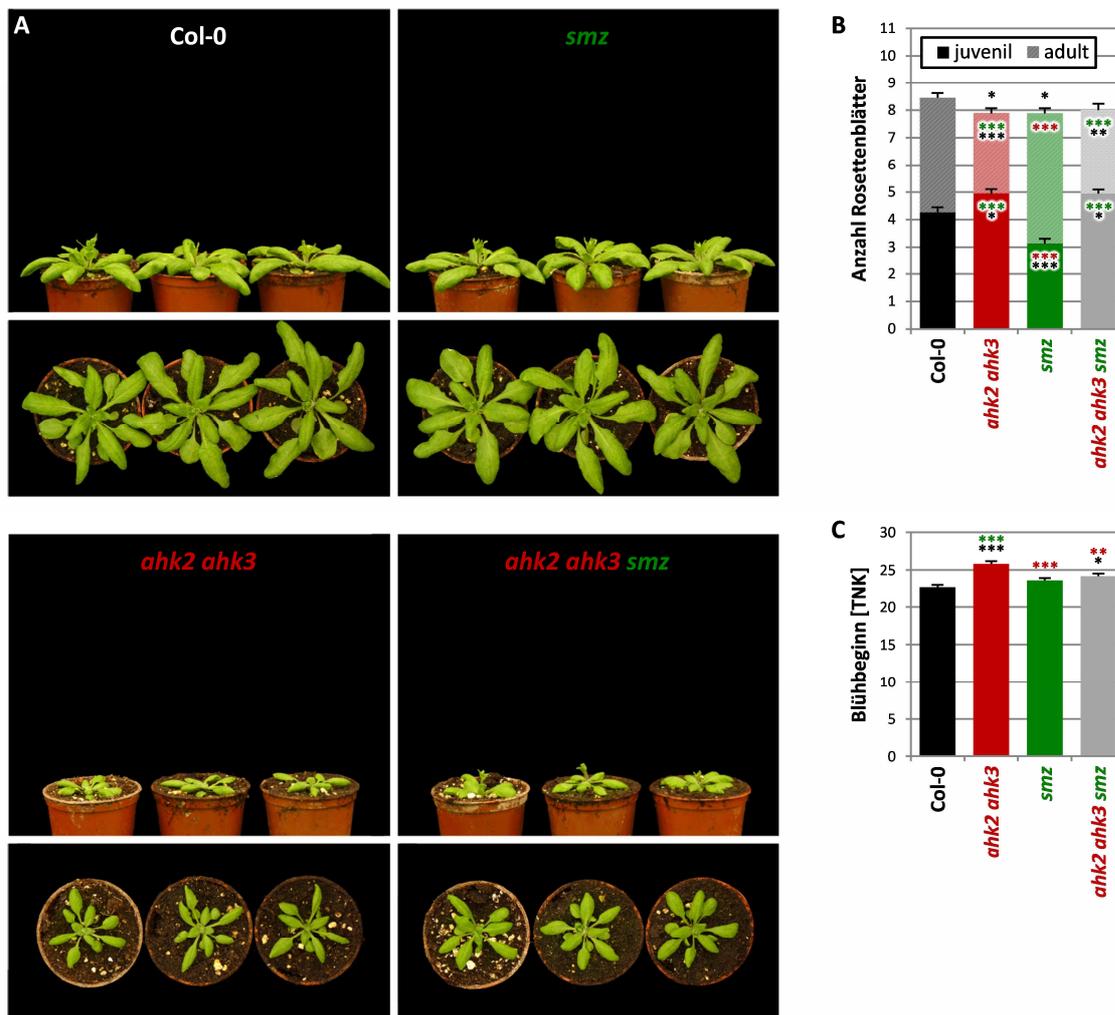


Abb. 52: *Ahk2 ahk3 smz*-Pflanzen ähneln mit einer verlängerten juvenilen und einer verkürzten adulten Phase der *ahk2 ahk3*-Doppelmutante. (A) Phänotyp von *ahk2 ahk3 smz* im Vergleich zu Col-0, *ahk2 ahk3* und *smz* (24 TNK); (B) Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter; (C) Blühzeitpunkt (TNK).

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen; bei den Wildtyp- und *ahk2 ahk3*-Pflanzen handelt es sich um dieselben, die auch in Abb. 47 benutzt wurden; Fotos und Datenerhebung: Jutta Hoffmann. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) n = 15-17; (B) n = 22-28); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, bezogen auf Wildtyp (schwarz), *ahk2 ahk3* (rot) und *smz* (grün) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

Die Juvenil- und die Adultphase von *rock2 smz*-Pflanzen ist jeweils in ähnlicher Weise wie bei *rock2*-Pflanzen verkürzt (Abb. 51A und Abb. 51B). Zudem blühen die Pflanzen etwa zeitgleich mit *rock2* und *smz* (Abb. 51C). Die Anzahl an juvenilen und adulten Rosettenblättern bei *ahk2 ahk3 smz*-Pflanzen ähnelt sehr stark der von *ahk2 ahk3* (Abb. 52B), der Blühbeginn der Dreifachmutante liegt zwischen den Blühzeitpunkten von *smz* und *ahk2 ahk3* (Abb. 52A und Abb. 52C).

Wie bereits erwähnt, werden miR156 und miR172 in *Arabidopsis* jeweils von mehreren Genen kodiert (*MIR156A-H*, *MIR172A-E*). Um die Funktionen der beiden miRNAs zu studieren, generierten Franco-Zorrilla, Todesco und Kollegen als Alternative zur Herstellung von Achtfach- bzw. Fünffachmutanten sog. Zielgen-Mimikry-Linien. In den transgenen Mimikry-Linien führt die Überexpression eines künstlichen Zielgens zur Reduktion der Aktivität ganzer miRNA-Familien (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007; Todesco *et al.*, 2010). Die verschiedenen Konstrukte und die entsprechenden transgenen Linien werden „MIM“ genannt, gefolgt von der Nummer der zu regulierenden miRNA-Familie. Die Konstrukte *p35S:MIM156* und *p35S:MIM172* wurden mittels *A. tumefaciens* in Col-0 transformiert und die T1-Pflanzen mit der stärksten Transgenexpression wurden zum Kreuzen mit *rock2* und *ahk2 ahk3* verwendet.

p35S:MIM156 (MIM156) ähnelt sehr stark der in dieser Arbeit verwendeten *pSPL9:GFP-rSPL9*-Linie (Abb. 46 und Abb. 47) und anderen transgenen Linien, die miR156-resistente *SPL*-Varianten exprimieren (Wu & Poethig, 2006; Franco-Zorrilla *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Todesco *et al.*, 2010): MIM156-Pflanzen beginnen bereits nach Bildung zweier adulter Blätter zu blühen (Abb. 53A und Abb. 54A). Genauso verhält es sich auch bei *rock2* MIM156 (Abb. 53A und Abb. 54A), allerdings beginnen die Pflanzen erst nach $19 \pm 0,3$ Tagen und damit etwa zeitgleich mit dem Wildtyp zu blühen, während *rock2* und MIM156 bereits mit $16,5 \pm 0,2$ bzw. $17,4 \pm 0,3$ Tagen zur reproduktiven Phase übergehen (Abb. 53A und Abb. 54B). Auch *ahk2 ahk3* MIM156-Pflanzen blühen erst nach $19 \pm 0,2$ Tagen (Abb. 54B), allerdings produziert diese Linie auch mehr Rosettenblätter (Abb. 54A). Dabei zeigt sich interessanterweise, dass der Ausfall der beiden Rezeptoren in der Lage ist, die juvenile Phase wiederherzustellen ($3,8 \pm 0,3$ Rosettenblätter), auch wenn sie im Vergleich zum Wildtyp ($4,6 \pm 0,1$ juvenile Blätter) etwas kürzer ausfällt (Abb. 54A). Die adulte Phase der *ahk2 ahk3* MIM156-Pflanzen ist mit durchschnittlich einem Rosettenblatt sogar noch kürzer als in MIM156- und *rock2* MIM156-Pflanzen (Abb. 54A).

Die Anwesenheit weiterer 35S-Promotoren in den T-DNAs der *ahk2 ahk3*-Doppelmutante könnte allerdings zu einer epigenetischen Inaktivierung des Transgens geführt haben (Vaucheret *et al.*, 1998). Um dies auszuschließen, wurde die Transgenexpression überprüft. Dabei zeigte sich, dass die *MIM156*-Expression in *ahk2 ahk3* MIM156 tatsächlich etwas schwächer ist als in MIM156, allerdings wird das Transgen immer noch stark überexprimiert (Abb. 53B).

p35S:MIM172 (MIM172) produziert mehr Blätter als der Wildtyp und blüht dementsprechend spät (Abb. 53A und Abb. 54) (Todesco *et al.*, 2010). MIM172-Pflanzen produzieren durchschnittlich $5,4 \pm 0,2$ juvenile Rosettenblätter, während *rock2* MIM172 $4,7 \pm 0,2$ und *ahk2 ahk3* MIM172 $5,7 \pm 0,2$ juvenile

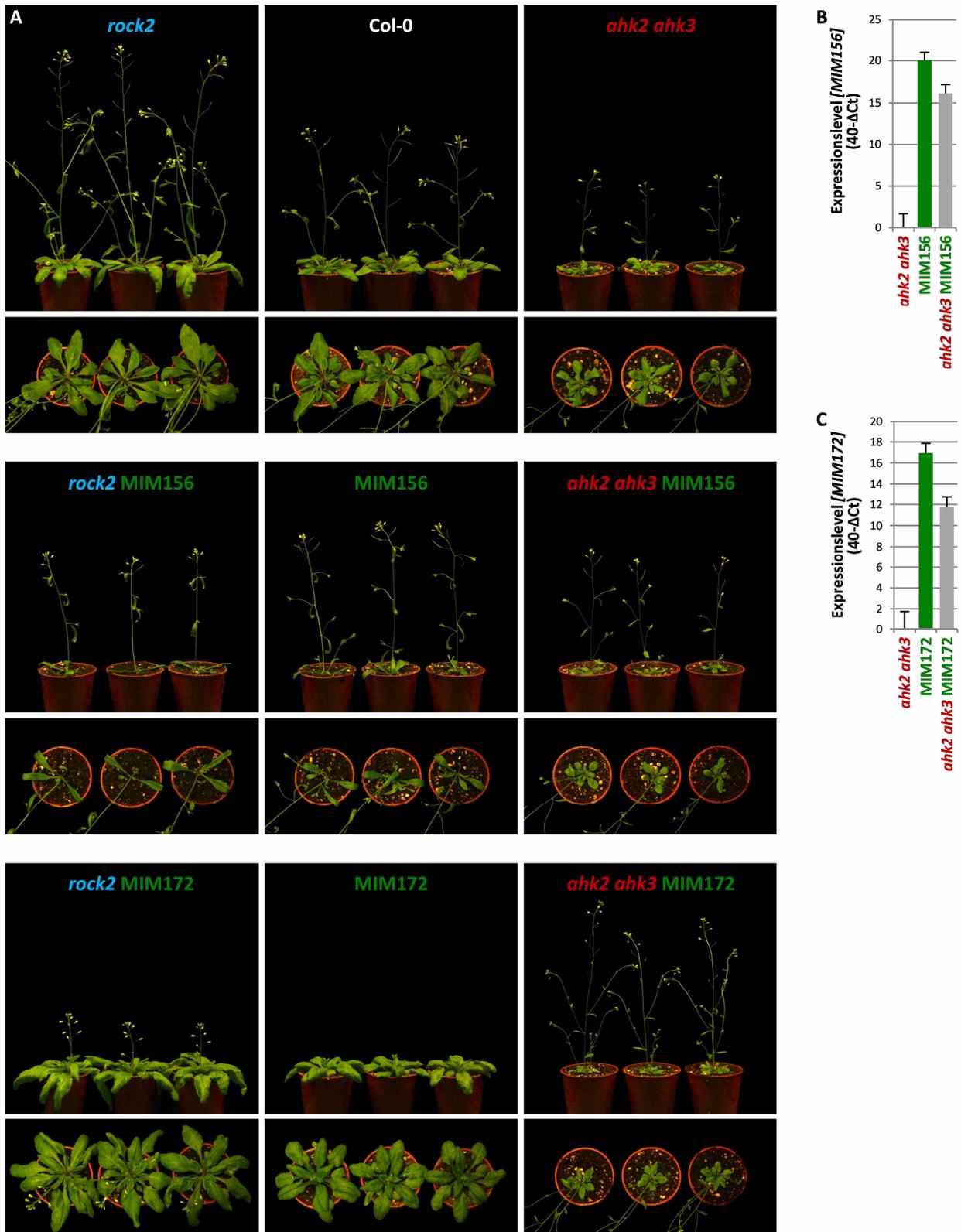


Abb. 53: MIM156- und MIM172-Kreuzungen mit *rock2* und *ahk2 ahk3*. (A) Phänotypen der MIM156- und MIM172-Kreuzungen im Vergleich zu *rock2*, Col-0, *ahk2 ahk3*, MIM156 und MIM172 (26 TNK). (B) Expressionslevel von MIM156 in *ahk2 ahk3*, MIM156 und *ahk2 ahk3* MIM156; (C) Expressionslevel von MIM172 in *ahk2 ahk3*, MIM172 und *ahk2 ahk3* MIM172; als Material wurden zehn Tage alte Keimlinge verwendet; dargestellt sind relative Werte; *ahk2 ahk3* wurde auf 0 gesetzt.

Die untersuchten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. (B, C) Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3); *PP2AA2* und *TAFII15* dienen als Referenzgene.

Blätter bilden (Abb. 54A). Der Genverlust von *AHK2* und *AHK3* im MIM172-Hintergrund hat wieder einmal eine Verkürzung der adulten Phase zur Folge (Abb. 54A).

Der Blühbeginn der MIM172-Pflanzen erfolgt mit $24,7 \pm 0,4$ TNK etwa 5,8 Tage später als beim Wildtyp (Abb. 54B). *Rock2* MIM172 blüht mit $22,6 \pm 0,3$ TNK etwas früher als MIM172 (Abb. 54B). *Ahk2 ahk3* MIM172 blüht trotz der hohen Blätterzahl bereits nach $16,8 \pm 0,2$ Tagen und damit fast so früh wie *rock2*-Pflanzen (Abb. 54B).

Auch im Fall von *ahk2 ahk3* MIM172 wurde die Expression des *MIM172*-Transgens überprüft. Auch hier zeigt sich im Vergleich zu MIM172 eine etwas geringere, aber immer noch sehr starke Überexpression (Abb. 53B).

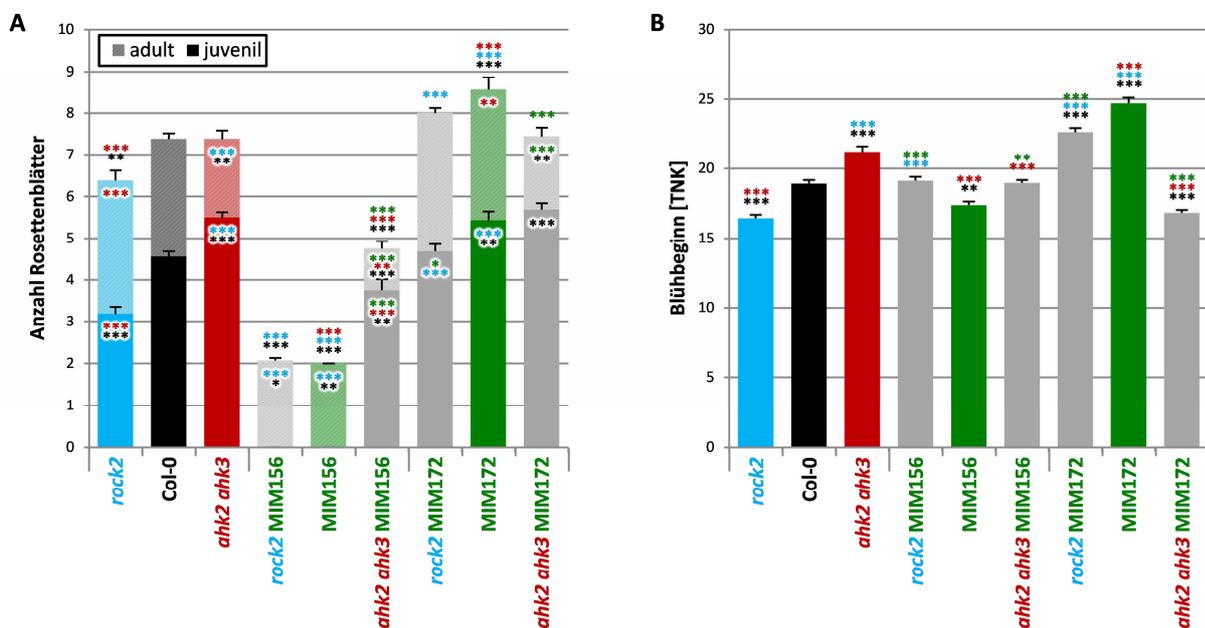


Abb. 54: Der Genverlust von *AHK2* und *AHK3* führt zu einer partiellen Wiederherstellung der juvenilen Phase in MIM156-Pflanzen. (A) Anzahl juveniler und adulter Rosettenblätter und (B) Blühzeitpunkt (TNK) von *rock2* MIM156, *ahk2 ahk3* MIM156, *rock2* MIM172 und *ahk2 ahk3* MIM172 im Vergleich zu *rock2*, Col-0, *ahk2 ahk3*, MIM156 und MIM172.

Die analysierten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ((A) $n = 16$; (B) $n = 22-24$); * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, bezogen auf Wildtyp (schwarz), *ahk2 ahk3* (rot) und die entsprechende MIM-Linie (grün) (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test); die Signifikanzen für die juvenile und adulte Blätterzahl sind innerhalb der jeweiligen Säulenabschnitte angegeben, die Signifikanzangabe oberhalb der Säule bezieht sich auf die Gesamtblätterzahl.

4. Diskussion

Pflanzen durchlaufen während ihres Lebenszyklus verschiedene Entwicklungsphasen, die durch die Ausprägung neuer morphologischer Merkmale und/oder die Bildung neuer Organe gekennzeichnet sind. Nach der Samenkeimung erfolgt zunächst eine vegetative Phase, in der an der Peripherie des Sprossapikalmeristems (SAMs) Blätter gebildet werden. Das Blattwachstum wird durch Zellteilung und nachfolgende Zellexpansion reguliert, zwei Prozesse, deren Dauer und Rate die endgültige Größe eines Organs determinieren. Während der vegetativen Phase zeigen sich zudem graduelle Veränderungen der Blattgröße sowie der Blattform. In der juvenilen vegetativen Phase, in der Pflanzen nicht in der Lage sind zu blühen, selbst wenn alle endogenen und exogenen Faktoren dafür vorliegen, sind die Blätter rundlich und klein. Mit dem Übergang zur adulten Entwicklungsphase, mit der die Pflanze Blühkompetenz erlangt, werden die Blätter zunehmend größer und länglicher und die Zahnung der Blattränder verstärkt sich. Die Länge dieser Phasen bestimmt die Anzahl der insgesamt gebildeten Blätter und trägt zusammen mit der Blattgröße im Wesentlichen zur gebildeten und für die Fotosynthese nutzbaren Biomasse bei. Außerdem haben die Zeitpunkte der Übergänge von juveniler zu adulter vegetativer Phase und von vegetativem zu reproduktivem Wachstum Einfluss auf den Blühbeginn.

Cytokinine sind in eine Vielzahl pflanzlicher Entwicklungsprozesse involviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Cytokininstatus der Epidermis auf die Größe von Organen sowie die Rolle des Phytohormons bei der Regulation von Entwicklungsübergängen untersucht. Nachfolgend werden die gesammelten Ergebnisse interpretiert und in den aktuellen Forschungskontext eingeordnet.

4.1. Charakterisierung von transgenen Pflanzen mit verändertem Cytokininstatus in der Epidermis

4.1.1. Die Expression von *pATML1:LOG4*, *pATML1:ARR1-SRDX-4xMyc* und *pATML1:CKX1-4xMyc* wirkt sich auf den Cytokininstatus aus

In dieser Arbeit wurde mithilfe von transgenen Linien, die *LOG4*, *ARR1-SRDX* oder *CKX1* unter der Kontrolle des *pATML1*-Promotors exprimieren, der Einfluss des Cytokininstatus der Epidermis auf die Größendetermination von Organen, vor allem von Rosettenblättern, untersucht. Die Untersuchung der *p35S*-Überexpressionskonstrukte zeigte, dass die klonierten Gene funktional sind (Abb. 6) und von den drei getesteten Epidermis-spezifischen Promotoren *pATML1*, *pMIR165A* und *pPDF1* wurde für die epidermale Expression der *ATML1*-Promotor ausgewählt, da er am besten charakterisiert ist und die stärksten phänotypischen Veränderungen hervorrief. Verglichen mit dem Wildtyp zeigten die *pATML1*-Linien Größenunterschiede diverser Organe, die in den Abschnitten 4.1.2 und 4.1.3 besprochen werden.

Die Analyse des Expressionsmusters mittels *pATML1:GFP-GUS*-Pflanzen bestätigte die *pATML1*-Aktivität im Protoderm des SAMs und der Blattprimordien und in der Epidermis junger Blätter (Abb. 7) (Lu *et al.*,

1996). Cytokinine bilden Gradienten (Jacqumard *et al.*, 2002; Corbesier *et al.*, 2003; Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016), sodass davon auszugehen ist, dass durch die Expression von *LOG4* und *CKX1* in der Epidermis auch cytokininvermittelte Prozesse außerhalb der Expressionsdomäne beeinflusst werden. Die Expression von *LOG4* und *CKX1* in der Epidermis führte zu einer Zunahme bzw. zu einer Abnahme der *ARR4*- und *ARR6*-Transkriptmenge (Abb. 12). In den AAS-Linien zeigte nur *ARR4* eine verringerte Expression im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 12). Obwohl beide Typ-A-*ARR*-Gene im Spross aktiv sind (To *et al.*, 2004), zeigte interessanterweise eine klonale Expressionsanalyse, dass *ARR4*, nicht aber *ARR6* in der L1-Schicht und der Epidermis exprimiert werden (Yadav *et al.*, 2014), was die Unterschiede der Expression der beiden getesteten Typ-A-*ARR*-Gene in AAS-Pflanzen erklärt und die Spezifität der Hemmung der Cytokininsignalkaskade in der Epidermis dieser Linien bestätigt.

Die Messung der Abundanz der verschiedenen Cytokininmetabolite im Spross der AL-Linien zeigte, dass die *pATML1:LOG4*-Expression hauptsächlich eine Erhöhung der *tZ*- und *DHZ*-Cytokinine bewirkte (Tab. 27). Dies steht im Gegensatz zu *p35S:LOG4*-Pflanzen, in denen *iP*-Formen eine höhere und *tZ*-Formen eine geringere Abundanz als in Wildtyppflanzen aufweisen (Kuroha *et al.*, 2009). Kuroha *et al.* (2009) nutzten für ihre Messungen allerdings drei Wochen alte Pflanzen, während für die AL-Linien aufgrund der Aktivität des Promotors in jungem Gewebe sieben Tage alte Keimlinge verwendet wurden. Die Abundanz und Wichtigkeit von *iP*- und *tZ*-Cytokinen verändert sich im Laufe der pflanzlichen Entwicklung (Sakakibara, 2006), was die unterschiedlichen Auswirkungen einer *LOG4*-Überexpression auf die Cytokininmetabolitabundanz erklären würde. Auch eine gewebsspezifische Verbreitung der verschiedenen Metabolite ist dokumentiert. So ist z. B. *tZR* die vorherrschende Cytokininform im Xylem (Beveridge *et al.*, 1997; Takei *et al.*, 2001b; Hirose *et al.*, 2008), während im Phloem *iP*-Cytokine, wie z. B. *iPR* und *iP*-Nukleotide (Corbesier *et al.*, 2003; Hirose *et al.*, 2008), am häufigsten vertreten sind. Durch die unterschiedlichen Expressionsmuster des *35S*-Promotors, der eine starke konstitutive und ubiquitäre Expression gewährleistet (Benfey & Chua, 1990), und des Epidermis-spezifischen *ATML1*-Promotors könnten für die Produktion der freien Basen durch *LOG4* also unterschiedliche Substrate verfügbar sein. Durch die Aktivität der Adenylat-Isopentenyltransferasen *IPT1* und *IPT3-IPT8* entstehen zunächst *iPRDP* und *iP RTP* (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2003; Sakano *et al.*, 2004), deren Isoprenoidseitenkette anschließend durch die Cytochrom-P450-Monooxygenasen *CYP735A1* und *CYP735A2* hydroxyliert werden, um die entsprechenden *tZ*-Nukleotide zu bilden (Takei *et al.*, 2004a). Es ist gut vorstellbar, dass die starke Reduktion an *tZ*-Metaboliten in *p35S:LOG4* dadurch zustande kommt, dass die gebildeten *iP*-Nukleotide unmittelbar in freies *iP* umgewandelt werden, sodass sie für die Bildung von *tZ*-Nukleotiden nicht mehr zur Verfügung stehen. In den *pATML1*-Linien findet die Cytokininaktivierung hingegen nur in der Epidermis statt. Andere Gewebe sind nicht betroffen und könnten eine eventuelle Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses der verschiedenen Cytokininmetabolite sogar kompensieren.

In den AC-Linien war die Abundanz von iP-, tZ- und cZ-Cytokinen auf 41 %, 26 % bzw. 42 % des Wildtypniveaus reduziert, während die Abundanz von DHZ-Formen um 81 % erhöht war (Tab. 27). DHZ-Metabolite machen nur einen Bruchteil der Cytokiningesamtmenge aus, sodass die ektopische *CKX1*-Expression eindeutig Cytokindefizienz hervorruft. Unter den freien Basen waren iP, tZ und cZ auf 65 %, 30 % bzw. 68 % des Wildtypniveaus reduziert, DHZ um 57 % erhöht (Abb. 11A). Unter den Zeatinformen zeigen cZ und DHZ die schwächste Rezeptorbindung (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006; Heyl *et al.*, 2012) und über ihre Funktionen in der Pflanze gibt es bisher nur wenige Informationen. Da DHZ aber weitestgehend resistent gegenüber dem Abbau durch CKX-Enzyme ist (Mok & Mok, 2001), könnte die Erhöhung der DHZ-Metabolite in den AC-Linien ein Hinweis auf Kompensation des stark reduzierten Cytokiningehalts durch die *CKX1*-Überexpression sein.

AL-Pflanzen verfügten über mehr freie Basen als der Wildtyp, vor allem Zeatinformen (tZ: 136 %, cZ: 166 %, DHZ: 130 %) (Abb. 11A). Die epidermale Expression von *LOG4* führt demnach zu der beabsichtigten Verstärkung der Cytokinaktivierung in den AL-Linien. Interessanterweise konnte in den AL-Linien nur eine geringfügige Reduktion der Ribosid-5'-Monophosphate (RMPs) festgestellt werden, die als Substrate für die LOG-Enzyme dienen (Kurakawa *et al.*, 2007; Kuroha *et al.*, 2009; Tokunaga *et al.*, 2012). Bei den durch Kuroha *et al.* (2009) durchgeführten Cytokininmessungen in p35S:LOG4-Pflanzen zeigte sich eine deutlich drastischere Reduktion, sodass erneut die begrenzte *LOG4*-Expression und/oder Kompensierungsmechanismen für die unterschiedlichen Effekte in AL- und p35S:LOG4-Pflanzen verantwortlich sein könnten. Die Expression beider Transgene führt zu einer verstärkten Bildung von Cytokininglucosiden (Abb. 11D, Abb. 11E) (Kuroha *et al.*, 2009). Diese entstehen durch Inaktivierungsprozesse, die in den transgenen Pflanzen offensichtlich der vermehrten Bildung von bioaktiven Cytokinen entgegenwirken. Zusammenfassend zeigten die Überprüfung des *pATML1*-Expressionsmusters sowie die Messungen von Cytokininmetaboliten und der Expression primärer Cytokininantwortgene, dass die *pATML1*-Transgene in der Epidermis die Cytokininsignaltransduktion (ARR1-SRDX) bzw. den Cytokininmetabolismus (*CKX1*, *LOG4*) beeinflussen, wodurch lokale bzw. weitreichendere Effekte über die Expressionsdomäne hinaus verursacht werden. Diese wirken sich letztendlich auf die Größe verschiedener Organe aus, die im nächsten Abschnitt behandelt werden.

4.1.2. Die epidermale Expression von *LOG4*, *ARR1-SRDX* und *CKX1* beeinflusst das Sprosswachstum

4.1.2.1. Blatt- und Rosettenwachstum

Die Expression von *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* wirkt sich auf die SAM-Größe aus

Der Cytokininstatus beeinflusst wesentlich die Größe und Aktivität des SAMs sowie die Größe der gebildeten Organe (Werner *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Miyawaki *et al.*, 2006;

Bartrina *et al.*, 2011; Tokunaga *et al.*, 2012; Kiba *et al.*, 2013). Cytokinindefizienz führt zur Bildung kleinerer SAMs aufgrund einer geringeren Zellzahl (Werner *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004), während ein höherer Cytokininstatus eine Vergrößerung des SAMs mit mehr Zellen zur Folge hat (Bartrina *et al.*, 2011). Entsprechend resultierte die *pATML1:CKX1-4xMyc*-Expression in einem kleineren Meristem, während *pATML1:LOG4*-Expression zur Ausbildung eines größeren SAMs führte (Abb. 16).

Cytokinin ist ein wichtiger Regulator der Meristemfunktion. Der Transkriptionsfaktor *STM* induziert die Cytokininbiosynthese im SAM durch Förderung der *IPT7*-Expression. *Stm*-Mutanten, die nicht zur Aufrechterhaltung des SAMs in der Lage sind, können durch exogene Cytokininapplikation gerettet werden (Long *et al.*, 1996; Jasinski *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2005). In transgenen Pflanzen, die Cytokinin überproduzieren, lassen sich erhöhte *STM*-Level nachweisen (Rupp *et al.*, 1999), was auf eine positive Rückkopplungsschleife zwischen *STM* und Cytokinin schließen lässt. Der Transkriptionsfaktor *WUS* reprimiert die Expression mehrerer Typ-A-*ARR*-Gene und erhöht dadurch die Cytokininsensitivität einiger Zellen im Meristem (Leibfried *et al.*, 2005). Cytokinin induziert wiederum die *WUS*-Expression (Gordon *et al.*, 2009). Darüber hinaus hemmt Cytokinin die Expression des *CLV1*-Gens, dessen Genprodukt die *WUS*-Domäne begrenzt (Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000; Lindsay *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2009).

Eine wichtige Rolle als Cytokininquelle des SAMs kommt wahrscheinlich der L1-Schicht zu (Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016), welche die Epidermis bildet. Von den sieben *Arabidopsis*-*LOG*-Genen ist nur *LOG4* im SAM selbst exprimiert, *LOG7* ist im Sprossapex vor allem in Primordien aktiv, wenngleich Yadav *et al.* (2009) auch eine *LOG7*-Expression in einer begrenzten Region im oberen Teil des Meristems zeigten, die durch andere Arbeiten jedoch nicht bestätigt werden konnte (Yadav *et al.*, 2009; Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016). Interessanterweise sind beide Gene entlang des Protoderms exprimiert, *LOG4* in der L1-Schicht des SAMs, *LOG7* in der L2-Schicht von Primordien. Computermodelle in Kombination mit experimentellen Daten zeigten, dass die Aktivität von *LOG4* möglicherweise einen Hormongradienten etabliert, der den Zellen des organisierenden Zentrums (OZ) Informationen über die Position des OZ relativ zur L1-Schicht liefern könnte, um die Meristemorganisation unabhängig von Zellteilungsaktivität und Zelldifferenzierungsprozessen aufrechtzuerhalten (Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016). Es kann spekuliert werden, dass die Veränderung des von der L1 ausgehenden Cytokiningradienten (Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016) in den *pATML1*-Linien einen Einfluss auf die Position und Größe der *WUS*-Domäne im SAM und damit auf die Größe und Aktivität der Stammzellpopulation haben könnte. Gleichzeitig könnte der veränderte Cytokininstatus im SAM Einfluss auf die *STM*-Expression und damit auf die Anzahl der teilungsaktiven Zellen haben.

Eine durch einen veränderten Cytokininstatus hervorgerufene Größenveränderung des SAMs hat häufig Einfluss auf die Organinitiationrate (Werner *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006; Bartrina *et al.*, 2011). Die Bestimmung des Plastochronindex der AL-, AAS- und AC-Linien förderte unter LD-Bedingungen jedoch keine Veränderungen zutage, nur unter SD-Bedingungen wiesen AC-Pflanzen ein

verlängertes Plastochron auf (Abb. 17). Dies könnte auf einen Einfluss der Fotoperiode auf die Regulation der Organbildungsrate durch Cytokinin schließen lassen. Allerdings zeigen cytokinindefiziente Pflanzen auch unter LD-Bedingungen niedrigere Blattbildungsraten (Werner *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2004; Hutchison *et al.*, 2006; Miyawaki *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006; Tokunaga *et al.*, 2012). Daher sind die unterschiedlichen Ergebnisse der Plastochronmessungen *pATML1:CKX1-4xMyc*-exprimierender Pflanzen unter SD- und LD-Bedingungen wahrscheinlich auf die langsamere Entwicklung bei SD-Verhältnissen und die damit einhergehende bessere Messbarkeit kleiner Unterschiede zurückzuführen.

Die Organinitiation in der peripheren Zone (PZ) des SAMs wird in erster Linie durch Auxin reguliert und durch ein lokales Maximum des Phytohormons ausgelöst (Benková *et al.*, 2003), welches durch PIN1 zur nächsten Organinitiationsstelle transportiert wird (Reinhardt *et al.*, 2003; Heisler *et al.*, 2005). Dort aktiviert Auxin unabhängig von Cytokinin und STM die Expression des Cytokinin-Signalkaskade-Inhibitors *AHP6* (Besnard *et al.*, 2014a; 2014b). Da die *pATML1*-Linien keinerlei phyllotaktische Defekte aufwiesen, wie es in der *pin1*- und der *ahp6*-Mutante der Fall ist (Guenot *et al.*, 2012; Besnard *et al.*, 2014a), und die *AHP6*-Expression cytokininunabhängig ist, kann geschlossen werden, dass der veränderte Cytokininstatus in den *pATML1*-Linien keinen Einfluss auf die Auxin-vermittelte Organinitiation hat. Wahrscheinlich führt die *pATML1:CKX1-4xMyc*-Expression zu einer geringeren Zellteilungsaktivität im SAM (s. unten), woraus die verzögerte Initiation neuer Blätter resultiert.

Die *pATML1*-Transgene beeinflussen die Zellteilungsaktivität in sich entwickelnden Blättern

Die Ergebnisse der Analyse des Blattwachstums der *pATML1*-Linien lassen auf eine veränderte SAM-Aktivität bzw. Anzahl an teilungsfähigen Zellen im Meristem schließen. AL-Pflanzen zeigten verstärktes Blattwachstum, während AAS- und AC-Pflanzen eine reduzierte Blattfläche aufwiesen (Abb. 19A, Abb. 19B). Das siebte Rosettenblatt von AL-Pflanzen war durchschnittlich 42 % größer als das entsprechende Blatt des Wildtyps. Bei AAS-Pflanzen war die Blattgröße auf etwa 89 % des Wildtypwertes reduziert, bei AC-Pflanzen sogar auf 37 %. Diese Veränderungen waren das Resultat verstärkter bzw. verminderter Zellteilungsaktivität: Die Analyse der abaxialen Epidermis des jeweils siebten Rosettenblattes ergab, dass die Blätter *pATML1:LOG4*-exprimierender Pflanzen eine höhere Anzahl an epidermalen Zellen aufwiesen, deren Größe mit der von Wildtyppflanzen vergleichbar war. Aufgrund der größeren Blattfläche waren aber insgesamt mehr Zellen vorhanden. AAS- und AC-Pflanzen produzierten hingegen weniger epidermale Zellen, wobei bei AC-Pflanzen zudem eine starke Zellvergrößerung festzustellen war (Abb. 19A-E). Die Entwicklung stomatärer Schließzellen verlief in allen analysierten Linien normal (Abb. 19F), was darauf hindeutet, dass die Differenzierungsprozesse in den Blättern nicht vom unterschiedlichen Blattwachstum betroffen waren.

Die aufgrund einer veränderten Zellproliferationsrate und/oder -dauer veränderte Blattgröße der *pATML1*-Linien spiegelte sich auch bei der Messung des Rosettendurchmessers wider. AL-Pflanzen

zeichneten sich durch eine vergrößerte Rosette aus, während AAS- und AC-Pflanzen kleinere Rosetten aufwiesen (Abb. 18A). Die Bestimmung der Wachstumsrate offenbarte, dass AL-Rosetten schneller wuchsen und ihre Wachstumsrate sogar höher war als bei *rock2* (Abb. 18B), für die ebenfalls ein verstärktes Rosettenwachstum aufgrund einer höheren Zellteilungsrate dokumentiert ist (Jensen, 2013). Während für die AAS-Linien nur eine geringfügige Reduktion der Rosettenwachstumsrate zu beobachten war, war diese bei den AC-Linien um etwa die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp verringert und zudem vergleichbar zu *ahk2 ahk3* (Abb. 18B), für die als einzige Rezeptordoppelmutante eine starke Reduktion des Sprosswachstums publiziert ist (Higuchi *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Interessanterweise setzten AC-Pflanzen im Gegensatz zu allen anderen getesteten Linien das Rosettenwachstum auch nach dem Übergang zur reproduktiven Phase noch fort (Abb. 18C), ein Phänomen, das bereits für p35S:CKX1 und p35S:CKX3 dokumentiert ist (Werner *et al.*, 2003).

Die endgültige Organgröße ist das Ergebnis der anfänglichen Zellteilungsaktivität gefolgt von einer Phase von Zellexpansion und -differenzierung. Die Kompensation der verringerten Blattfläche durch eine verlängerte Zellexpansionsphase ist ein weit verbreitetes Phänomen bei cytokinindefizienten Pflanzen, z. B. bei CKX-überexprimierenden Pflanzen (Werner *et al.*, 2003). Die verstärkte Zellexpansion in AC- und p35S:CKX-Pflanzen ist nicht in der Lage, die Reduktion der Blattfläche auszugleichen, was zeigt, dass die kleineren Blätter vor allem das Resultat einer verminderten Zellproliferation darstellen. Auch in *an3*- und *ant*-Mutanten sowie in transgenen Pflanzen, die den *cyclin-dependent-kinase*(CDK)-Inhibitor KRP2 überexprimieren, kommt es zu einer reduzierten Zellzahl und zu einer Zunahme der Zellgröße, die allerdings nicht ausreicht, um die Abnahme der Blattfläche zu kompensieren (Mizukami & Fischer, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Horiguchi *et al.*, 2005). Diese Gene könnten somit an der durch Cytokinindefizienz beeinträchtigten Zellproliferation beteiligt sein.

Die partielle Kompensation der verminderten Zellproliferation durch eine Zunahme der Zellgröße deutet auf eine Entkopplung der Zellexpansion von der Zellteilung hin. Ein ähnliches Phänomen konnte bereits in Tabakpflanzen mit reduzierter Typ-A-CDK-Aktivität beobachtet werden (Hemerly *et al.*, 1995). Die Fähigkeit zur Entkopplung von Zellteilung und -expansion illustriert eindrucksvoll die Plastizität von Zellen in Reaktion auf Veränderungen der Zellteilungsaktivität. Auf welche Weise dies erreicht wird, ist bisher nicht geklärt. Einen möglichen Erklärungsansatz liefert Abschnitt 4.2.5. Gibberelline (GAs) und Cytokinine übernehmen bei der Regulation von Wachstumsprozessen im Spross antagonistische Funktionen: Cytokinin fördert die Zellteilung, während GAs vor allem Zellwachstum stimulieren. GA-Messungen zeigten, dass der GA-Gehalt in cytokinindefizienten Pflanzen erhöht war, sodass GAs möglicherweise die durch Cytokinindefizienz verursachte verringerte Zellteilungsaktivität durch verstärkte Zellexpansion kompensieren.

Mögliche Rolle von Cytokinin bei der Regulation des Blatt- bzw. Rosettenwachstums

Die Untersuchungen zum Blatt- bzw. Rosettenwachstum der *pATML1*-Linien zeigte, dass der Cytokininstatus einer Pflanze das Organwachstum in erster Linie durch eine veränderte Zellteilungsaktivität beeinflusst. Unklar bleibt, ob Cytokinin die Zellproliferationsrate oder die Dauer der Zellteilungsphase oder beides beeinflusst. Man kennt inzwischen eine erhebliche Anzahl an Faktoren, die diese beiden Prozesse in verschiedenen Stadien der Blattentwicklung beeinflussen.

Das größere bzw. kleinere SAM bei AL- und AC-Pflanzen könnte sich auf die Anzahl der Blattgründerzellen auswirken. Es konnte gezeigt werden, dass sich Veränderungen in der Blattgründeranzahl auf die Größe von Blättern auswirken können (Autran *et al.*, 2002; Eloy *et al.*, 2012). Das *STRUWWELPETER(SWP)*-Gen kodiert ein Protein, das Ähnlichkeiten zu einer aus Tier und Hefe bekannten Unter-einheit des Mediatorkomplexes der RNA-Polymerase II hat. Die *swp*-Mutante besitzt ein desorganisiertes Meristem und reduzierte Zellzahlen in allen oberirdischen Organen, die z. T. durch Zellgrößenzunahme kompensiert werden. Die kleineren Organe sind das Resultat einer verkürzten Zellproliferationsphase während der Primordieninitiation (Autran *et al.*, 2002). *SAMBA* kodiert für einen pflanzenspezifischen, negativen Regulator des *anaphase-promoting-complex/cyclosome*(APC/C)-Komplexes (Eloy *et al.*, 2012). Der APC/C-Komplex ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die die ubiquitinabhängige Proteolyse von regulatorischen Schlüsselproteinen des Zellzyklus reguliert und die u. a. den Abbau mitotischer Cycline am Übergang von der Meta- zur Anaphase vermittelt (Heyman & De Veylder, 2012). *SAMBA* ist ein negativer Regulator der Zellproliferation während der frühen Blattentwicklung und *Loss-of-function*-Mutanten bilden größere Blätter, die aus einer Vergrößerung des SAMs resultieren (Eloy *et al.*, 2012).

Auch in der späteren Organentwicklung spielt Cytokinin eine entscheidende Rolle. Cytokinin reguliert eine Vielzahl von Zellzyklusfaktoren und fördert auf diese Weise die Zellteilung im Spross (Schaller *et al.*, 2014). Cytokinin aktiviert die Zellteilung u. a. durch Typ-D-Cyclin *CYCD3* (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). Auch Auxin aktiviert die *CYCD3*-Expression über *ARGOS* und *ANT* (Mizukami & Fischer, 2000; Hu *et al.*, 2003) bzw. über *EBP1* (Squatrito *et al.*, 2004; Horváth *et al.*, 2006) und Brassinosteroide haben ebenfalls einen positiven Einfluss auf die *ANT*- und *CYCD3*-Expression (Schruff *et al.*, 2006; Vert *et al.*, 2008). Zusammen mit den transkriptionellen Co-Aktivatoren der *GRF-INTERACTING-FACTOR*(GIF)-Familie halten die *GROWTH-REGULATING-FACTOR*(GRF)-Transkriptionsfaktoren die Zellproliferation aufrecht (Kim & Kende, 2004; Horiguchi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009a). GRFs werden über *miR396* durch Klasse-II-*TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF*(TCP)-Transkriptionsfaktoren reguliert. Für *TCP4* konnte gezeigt werden, dass es das proliferative Wachstum begrenzt, indem es die Sensitivität des Blattes gegenüber Cytokinin reduziert (Efroni *et al.*, 2013). *GIF1/ANGUSTIFOLIA3*(AN3) reguliert wiederum die Expression von *CRF2* und *ARR4*, indem es während der Blattentwicklung mit *SWI/SNF*-Chromatin-Remodeling-Komplexen interagiert (Vercruyssen *et al.*, 2014). In Primordien der *gif1 gif2 gif3*-Mutante werden *CYCB1* und weitere Zellzyklus-assoziierte Gene schwächer exprimiert, was zu einer verminderten Zell-

teilungsrate führt (Lee *et al.*, 2009a). Somit existiert ein komplexes regulatorisches Netzwerk aus Phytohormonen, Zellzykluskomponenten und weiteren Regulatoren der Zellproliferation, in dem Cytokinin eine wichtige Funktion einnimmt. Um die Zellteilungsprozesse bei der Blattentwicklung von AL- und AC-Pflanzen sichtbar zu machen und Aktivitätsunterschiede sowie eventuelle Veränderungen des Voranschreitens der *cell cycle arrest front* aufzudecken, wurden die starken *pATML1*-Linien AL #22 und AC #32 mit transgenen Pflanzen gekreuzt, die einen labilen Cyclin-GUS-Reporter exprimieren (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Leider konnte weder in der Referenzlinie noch in den doppelt transgenen Pflanzen eine Färbung im Spross festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Es gibt Hinweise darauf, dass das Organwachstum Konzentrationsgradienten eines oder mehrerer Morphogene unterliegt. Ein solches Wachstumsmodell wurde erstmals von Day & Lawrence (2000) basierend auf experimentellen Daten von *Drosophila* vorgeschlagen. Auxin bildet in *Arabidopsis*- und Tabakblättern einen Gradienten entlang der basipetalen Achse aus, der die Wachstumsachse des sich entwickelnden Blattes festlegt (Ljung *et al.*, 2001; Benková *et al.*, 2003). Das Cytochrom P450 KLUH/CYP78A5 produziert in der Organperipherie ein mobiles, zellteilungsstimulierendes Signal, dessen Konzentration mit zunehmender Größe des Blattes zur Blattmitte hin abnimmt und möglicherweise bei der Beendigung der Proliferationsphase eine Rolle spielt (Anastasiou *et al.*, 2007; Kazama *et al.*, 2010; Czesnick & Lenhard, 2015). Die in dieser und anderen Arbeiten beobachtete Korrelation von Cytokininstatus und Zellteilungsaktivität und die Wichtigkeit eines Cytokiningradienten für die SAM-Regulation (Chickarmane *et al.*, 2012; Gruel *et al.*, 2016) lassen spekulieren, ob derartige Cytokiningradienten auch die Zellteilung während des Blattwachstums koordinieren und begrenzen könnten. *LOG7*, das in der L2-Schicht von Organprimordien exprimiert ist (Gruel *et al.*, 2016), könnte hierbei eine Schlüsselrolle zukommen.

Die Rolle des epidermalen Cytokininstatus bei der Regulation des Rosettenwachstums

Die Epidermis begrenzt die Zellproliferation und -expansion in den darunterliegenden Geweben (Serralbo *et al.*, 2006; Bemis & Torii, 2007; Savaldi-Goldstein *et al.*, 2007; Marcotrigiano, 2010; Hartmann *et al.*, 2013). Die Expression von *LOG7* in der L2-Schicht auswachsender Primordien (Gruel *et al.*, 2016) könnte darauf hindeuten, dass das hier produzierte Cytokinin die Zellproliferation in der Epidermis stimuliert und gleichzeitig die Zellteilungsaktivität in den subepidermalen Geweben reguliert. Die Untersuchung der AAS-Linien, die sich durch eine lokale Hemmung der Cytokininsignaltransduktion in der Epidermis auszeichnen, machte einen zwar schwachen, aber messbaren Einfluss des epidermalen Cytokininstatus auf das Blatt- bzw. Rosettenwachstum deutlich. Allerdings ist die Stärke des Transgens und damit die Frage, ob es die Cytokininsignalkaskade in der Epidermis tatsächlich in Gänze ausschaltet, bisher nicht geklärt. AAS-Pflanzen bildeten etwa 8 % kleinere Blattrosetten bzw. 11 % kleinere Blätter, was mit dem um ca. 6 % langsameren Rosettenwachstum im Vergleich zum Wildtyp korrelierte (Abb. 18A, Abb. 18B, Abb. 19B). Eine klonale Expressionsanalyse zeigte, dass alle drei Cytokininrezeptoren im

Protoderm und in der Epidermis exprimiert werden, wenn auch vergleichsweise schwach (Yadav *et al.*, 2014). Die Analyse der doppelt transgenen AL AAS-Pflanzen zeigte, dass die epidermale Hemmung der Cytokininsignaltransduktion in der Epidermis den zellteilungsfördernden Effekt der *pATML1:LOG4*-Expression in den subepidermalen Geweben unterdrückt (Abb. 26). Die Ergebnisse untermauern die von Serralbo *et al.* (2006) und Marcotrigiano (2010) publizierten Daten, nach denen sich die Zellteilungsaktivität in der Epidermis auf die Zellteilungsaktivität in den darunterliegenden Geweben auswirkt. Das in dieser Arbeit genutzte artifizielle System lässt leider keine Rückschlüsse auf eine tatsächliche Größenlimitierung eines Organs durch den epidermalen Cytokininstatus zu. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit noch ein weiterer Ansatz verfolgt, bei dem versucht wurde, den Kleinwuchs der *ahk2 ahk3*-Doppelmutante durch epidermale Expression von *AHK2* bzw. *AHK3* zu revertieren. Leider blieb dieser ergebnislos, da keine dreifach homozygoten Linien selektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Auch die Analyse der Expressionsmuster der beiden Rezeptoren während des Blattwachstums würde wertvolle Informationen liefern, leider blieben auch die hierfür verfolgten Ansätze erfolglos (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise könnte die Nutzung genetischer Mosaik oder perikliner Chimären helfen, die Frage nach dem Beitrag des epidermalen Cytokininstatus auf das Blattwachstum zu beantworten (Serralbo *et al.*, 2006; Marcotrigiano, 2010).

Auch ein weiteres Szenario wird diskutiert, nach dem sich die Produktion von *very long chain fatty acids* (VLCFAs) in der Epidermis die Cytokininbiosynthese in der Vaskulatur supprimiert und auf diese Weise die Zellteilungsaktivität in den inneren Geweben und somit das Blattwachstum beeinflusst (Nobusawa *et al.*, 2013). Die Autoren zeigten, dass die Behandlung von Wildtyp- und *pATML1:CKX1*-Venus-Keimlingen mit dem VLCFA-Biosynthese-Inhibitor Cafenstrol zu einer Vergrößerung der Blattrosette führt, während bei *ipt3 ipt5 ipt7* und *pHB-8:CKX1*-Venus, in welcher *CKX1* unter der Kontrolle eines prokambiumspezifischen Promotors (Baima *et al.*, 1995) exprimiert wird, keine Cafenstrol-induzierte Blattvergrößerung zu beobachten ist. Zusätzlich ist in VLCFA-Biosynthesemutanten eine Erhöhung von *tZ* und *iP* messbar und nach Cafenstrolbehandlung verstärkt sich die *IPT3*-Expression in der Vaskulatur. Auf Grundlage dieser Ergebnisse postulierten Nobusawa *et al.* (2013) ihre Hypothese. Die von den Autoren genutzte *pATML1:CKX1*-Venus-Linie zeigte allerdings normales Wachstum, was im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen AC-Linien steht. Nobusawa *et al.* (2013) untersuchten nur vier unabhängige Linien, zudem führten sie keine Messungen des Cytokinengehalts in diesen Linien durch. Die Problematik einer C-terminalen Fusion an *CKX1* wurde bereits in Abschnitt 3.1.1 besprochen. Das verwendete Transgen wurde zwar in der Epidermis exprimiert, war aber möglicherweise gar nicht funktional. Die in der vorliegenden Arbeit generierten AC-Linien zeigten im Gegensatz zu den von den Autoren benutzten Linien keine Cafenstrol-induzierte Vergrößerung der Blattrosette (Abb. 27) und reagierten somit genauso auf die Behandlung mit Cafenstrol wie *ipt3 ipt5 ipt7* und *pHB-8:CKX1*-Venus. Allerdings geht der Effekt der *pATML1:CKX1-4xMyc*-Expression über die Expressionsdomäne hinaus, sodass auch

die inneren Gewebe der Blätter von der Reduktion des Cytokiningehalts betroffen sind. Es ist unwahrscheinlich, dass der Effekt von *pATML1:CKX1-Venus* einfach schwächer ausfällt und nicht so weit nach innen reicht, da die Autoren eine ähnliche Zellanzahl in *pATML1:CKX1-Venus*- und Wildtypblättern angeben und damit keinerlei Auswirkungen der Transgenexpression feststellbar sind, was darauf hindeutet, dass das Transgen nicht funktional war. Da sich ein Teil der Argumentation auf die Ergebnisse dieser Pflanzen stützt, muss der endgültige Beweis für die formulierte Hypothese noch erbracht werden.

AHK2, AHK3 und ARR1 sind die vermittelnden Faktoren bei der cytokininabhängigen Regulation des Rosettenwachstums

Viele Mutanten und transgenen Linien, die einen im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Cytokininstatus besitzen, bilden kleinere Blätter, u. a. Typ-B-ARR-Mehrfachmutanten (Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008) und *ahk2 ahk3* als einzige Doppelrezeptormutante (Higuchi *et al.*, 2004), wengleich für die *cre1 ahk3*-Mutante ebenfalls Tendenzen zu einer kleiner Rosette dokumentiert sind (Riefler *et al.*, 2006; Kiba *et al.*, 2013). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wiesen *cre1 ahk3* und *ahk2 ahk3* stets ein verringertes Sprosswachstum auf (Abb. 24). Dies könnte auf eine dominante Rolle von *AHK3* bei der Determination des Blattwachstums schließen lassen. Die *rock3*-Mutation resultiert allerdings nur dann in der Ausbildung größerer Blätter, wenn das Gen unter der Kontrolle eines ca. 2 kb-großen *AHK3*-Promotorfragments exprimiert wird, während die konstitutiv aktive Variante von *AHK2* sowohl in der *gain-of-function*-Mutante als auch in transgenen Pflanzen ein stärkeres Blattwachstum vermittelt (Jensen, 2013). Um herauszufinden, welche Rezeptoren und Typ-B-ARRs an dem verstärkten Rosettenwachstum bei AL-Pflanzen beteiligt sind, wurden Kreuzungen von AL #22 mit den Rezeptordoppelmutanten und den drei Typ-B-ARR-Doppelmutanten *arr1 arr10*, *arr1 arr12* und *arr10 arr12* untersucht. Dabei wurden *AHK2* und *AHK3* sowie *ARR1* als die entscheidenden Komponenten identifiziert (Abb. 24, Abb. 25). Im genetischen Hintergrund von *cre1 ahk2*, *cre1 ahk3* und *arr10 arr12* führte die Expression des Transgens zu einer messbaren Vergrößerung der Rosette im Vergleich zur entsprechenden Doppelmutante, während *ahk2 ahk3*, *arr1 arr10* und *arr1 arr12* den Effekt der *pATML1:LOG4*-Expression unterdrückte. *AHK2* und *AHK3* sind im Unterschied zu *CRE1/AHK4* im Spross sehr viel stärker exprimiert als in der Wurzel, was sich in dem reduzierten Sprosswachstum von *ahk2 ahk3* im Gegensatz zu *cre1 ahk2* und *cre1 ahk3* manifestiert (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). *ARR1* konnte in dieser Arbeit als zusätzliche Komponente der Cytokininsignalkaskade identifiziert werden, die maßgeblich das Sprosswachstum beeinflusst. Von den drei getesteten Typ-B-ARR-Doppelmutanten verfügte nur *arr1 arr12* von vornherein über eine kleinere Rosette, was auf eine unterstützende Funktion von *ARR12* schließen lässt. Weitere Typ-B-ARRs und auch *CRE1/AHK4* sowie weitere Komponenten der Cytokininsignalkaskade sind natürlich auch an der Regulation des Sprosswachstums beteiligt, was durch die drastischen Wachstumsdefekte von Cytokininmutanten höherer Ordnung deutlich wird (Nishimura *et al.*,

2004; Hutchison *et al.*, 2006; Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008). Kürzlich zeigte die Untersuchung von *loss-of-function*-Mutanten von *CRF*-Genen, dass diese einen negativen Einfluss auf das Sprosswachstum haben, mit einer dominanten Rolle von *CRF2* (Raines *et al.*, 2016). Die Überexpression von *CRF6* führt hingegen zu einer Vergrößerung der Rosette (Zwack & Rashotte, 2015), sodass den *CRFs* wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen beim Sprosswachstum zukommen. Beide Gene werden durch Cytokinin induziert, wobei *CRF2* sehr schnell (< 30 min) in Reaktion auf Cytokininbehandlung hochreguliert wird, während die Transkription von *CRF6* sehr viel langsamer zunimmt (Rashotte *et al.*, 2006), was auf eine Feinregulation des Sprosswachstums durch die beiden Gene hindeuten könnte. *AHP6* ist im Sprossapex und in jungen Blättern exprimiert (Tanaka *et al.*, 2004; Mähönen *et al.*, 2006) und könnte ebenfalls maßgeblich an der Determination der Organgröße beteiligt sein. Zukünftige Experimente werden zeigen, welche weiteren Cytokininsignaltransduktionskomponenten an den regulatorischen Prozessen, die das Sprosswachstum steuern, beteiligt sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* die Größe des vegetativen Meristems beeinflusst, möglicherweise durch die Veränderung des von der L1 ausgehenden Cytokiningradienten. Dies könnte nicht nur Auswirkungen auf die SAM-Aktivität, sondern zudem auf die Anzahl der teilungsfähigen Zellen haben. In den transgenen AL-, AAS- und AC-Pflanzen ist die Zellteilungsaktivität und damit die Wachstumsrate in sich entwickelnden Blättern verändert, was in größeren (AL) bzw. kleineren (AAS, AC) Blättern resultiert, wobei die reduzierte Blattgröße bei AC-Pflanzen partiell durch verstärkte Zellexpansion kompensiert wird. Die lokale Hemmung der Cytokininsignalkaskade in AAS-Pflanzen inhibiert die Zellteilung der epidermalen Zellen. Die Analyse der doppelt transgenen AL AAS-Pflanzen zeigte, dass dies zu einer Wachstumsbeschränkung des Blattes führt. Über eine tatsächliche Rolle des epidermalen Cytokininstatus bei der Blattgrößendetermination kann auf Grundlage der in dieser Arbeit generierten Ergebnisse keine Aussage getroffen werden. Die Cytokininrezeptoren *AHK2* und *AHK3* sowie der Typ-B-ARR *ARR1* (und möglicherweise *ARR12*) konnten als wichtige Faktoren bei der cytokininvermittelten Regulation des Rosettenwachstums identifiziert werden.

4.1.2.2. Stengeldurchmesser

Die *pATML1*-Linien wurden auf den Durchmesser der Infloreszenzstengel hin untersucht und mit *rock2*, Col-0 und *ahk2 ahk3* verglichen. Alle Linien mit einem erhöhten Cytokininstatus wiesen dickere Stengel auf, während die Verringerung des Cytokininstatus eine Reduktion des Durchmessers zur Folge hatte; einzig die Stengeldicke von AAS-Pflanzen war unverändert (Abb. 20). Cytokinin ist ein positiver Regulator der primären und sekundären Vaskularentwicklung und der kambialen Zellteilungsaktivität (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008; Nieminen *et al.*, 2008; Hejátko *et al.*, 2009). Pflanzen mit einem erhöhten Cytokininstatus, wie z. B. *ckx3 ckx5*, *rock2*, *rock3* und *IPT*-überexprimierende *Arabidopsis*-Pflanzen, weisen einen

dickeren Infloreszenzstengel auf (Rupp *et al.*, 1999; Bartrina *et al.*, 2011; Jensen, 2013). Das konstitutive Signal der Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 führt zu einer verstärkten Aktivität des faszikulären und interfazikulären Kambiums (Jensen, 2013). Cytokinindefizienz führt hingegen zu einer Abnahme des Stengeldurchmessers (Werner *et al.*, 2003; Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008; Nieminen *et al.*, 2008; Hejátko *et al.*, 2009). Die Stengel von Einzel- und Doppelmutanten der Cytokininrezeptorgene *AHK2* und *AHK3* sowie *p35S:CKX*-Pflanzen verfügen über weniger Zellschichten im Prokambium und kleinere Leitbündel. Zudem sind *ahk2 ahk3*-Doppelmutanten und *CKX*-Überexpressionspflanzen nicht in der Lage ein interfazikuläres Kambium auszubilden, was auf Defekte bei der Initiation des sekundären Dickenwachstums schließen lässt (Hejátko *et al.*, 2009). Auch in Pappel und Birke mit reduziertem Cytokiningehalt im Kambium sowie in *Arabidopsis-IPT*-Mehrfachmutanten ist das Dickenwachstum aufgrund einer starken Verringerung der kambialen Aktivität reduziert (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008; Nieminen *et al.*, 2008). Die Zu- bzw. Abnahme der Stengeldicke in den *pATML1*-Linien könnte demnach ebenfalls auf eine verstärkte bzw. verringerte Zellteilungsaktivität im Kambium zurückzuführen sein.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich durch die Größe der prokambialen Region im SAM. Eine höhere bzw. geringere prokambiale Zellzahl könnte ebenfalls die Stengeldicke beeinflussen. Der gleichzeitige Genverlust von *CKX3* und *CKX5*, die im OZ bzw. im Prokambium exprimiert sind, führt zu einem größeren Infloreszenzmeristem und zu einem dickeren Stengel (Bartrina *et al.*, 2011). Die Veränderung des Cytokininstatus des SAMs durch Expression von *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* könnte die Größe des SAMs und damit der prokambialen Region beeinflussen. Allerdings konnten keine Größenunterschiede des Infloreszenzmeristems in den *pATML1*-Linien festgestellt werden (Abb. 16).

ATML1 ist im Infloreszenzstengel selbst nicht exprimiert (Lu *et al.*, 1996). Allerdings ist bekannt, dass Cytokininmetabolite vom Bildungsort in andere Teile der Pflanze transportiert werden (Hirose *et al.*, 2005; Kudo *et al.*, 2010; Bishopp *et al.*, 2011a; Ko *et al.*, 2014). Darüber hinaus zeigten Pfropfungsversuche mit *ipt1,3,5,7*-Quadrupelmutanten, dass die Cytokininproduktion im Spross oder in der Wurzel des Wildtyps ausreicht, um die normale Kambiumentwicklung im *ipt1,3,5,7*-Gegenstück wiederherzustellen (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008). Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich der veränderte Metabolismus in AL- und AC-Pflanzen auch auf Teile der Pflanze auswirkt, in denen die Transgene nicht exprimiert werden, und somit transportiertes Cytokinin für den veränderten Stengeldurchmesser verantwortlich ist. Dies erklärt auch die unveränderte Stengeldicke in AAS-Pflanzen, da in diesen nur ein lokaler Effekt im Protoderm des SAMs und in der Epidermis junger Organe hervorgerufen wird.

4.1.2.3. Samenertrag

Der Cytokininstatus der *pATML1*-Linien korrelierte in positiver Weise mit dem Samenertrag. Die Ertragszunahme der AL-Pflanzen war auf eine höhere Anzahl an Samen pro Schote zurückzuführen (Abb. 22),

nicht auf eine verstärkte Schotenproduktion (Abb. 21). Die Zunahme der Wuchshöhe der AL-Linien resultierte aus einer stärkeren Internodienelongation und hatte somit keinen Einfluss auf die Anzahl der Schoten am Hauptspross. Auch die Anzahl der axillären Triebe war vergleichbar mit der des Wildtyps, sodass einzig die höhere Samenzahl in den Schoten für die Ertragszunahme verantwortlich sein kann.

Ein höherer Cytokininstatus ist häufig mit einer Ertragszunahme verbunden, sowohl in *Arabidopsis* (Bartrina *et al.*, 2011; Jensen, 2013) als auch in vielen anderen Pflanzenspezies (Jameson & Song, 2016). Die bereits erwähnte CKX-Doppelmutante *ckx3 ckx5* sowie die Dreifachmutante *ckx3 ckx5 ahp6* verfügen über ein vergrößertes Infloreszenzmeristem, dessen höhere Aktivität zur Produktion von mehr Blüten bzw. Schoten am Hauptspross führt, bei letztgenannter Mutante sogar um rund 47 % (Bartrina *et al.*, 2011). Auch *rock2*- und *rock3*-Pflanzen bilden mehr Schoten, was auf eine höhere Meristemaktivität in diesen Mutanten schließen lässt (Jensen, 2013). Die *pATML1:LOG4*-Expression führt hingegen nicht zur Ausbildung eines vergrößerten Infloreszenzmeristems (Abb. 16), dementsprechend ist auch die Meristemaktivität nicht beeinflusst und die Anzahl der Schoten am Hauptspross ist unverändert (Abb. 21C).

Bartrina *et al.* (2011) beschrieben erstmalig einen positiven Einfluss von Cytokinin auf die Größe des Gynoeceums und die Aktivität der Plazenta. Die Autoren stellten fest, dass der erhöhte Cytokininstatus in *ckx3 ckx5*-Pflanzen zu einer Vergrößerung der Gynoeceen und weiterer Blütenorgane führte und dass die Samenanlagen in geringerem Abstand zueinander angelegt wurden. Der Zusammenhang zwischen Cytokinin und Plazenta-Aktivität wurde weiter untermauert, als Bencivenga *et al.* (2012) zeigten, dass die Behandlung von Infloreszenzen mit dem synthetischen Cytokinin 6-Benzylaminopurin (BAP) zur Bildung neuer Primordien in der Plazenta führt und zwar zwischen den bereits vor der Cytokininapplikation gebildeten Samenanlagen.

Die Untersuchung der *ckx3 ckx5*-Gynoeceen offenbarte eine fast doppelt so große Zahl an Samenanlagen im Vergleich zum Wildtyp. Die um ca. 18 % größeren Schoten enthielten letztendlich auch mehr und enger gepackte Samen, wenngleich sich nicht alle Samenanlagen aufgrund der räumlichen Begrenzung zu reifen Samen entwickeln konnten (Bartrina *et al.*, 2011). In AL-Pflanzen konnte ebenfalls eine höhere Samendichte in den Schoten beobachtet werden (Abb. 22G), sodass auch hier von einer höheren Plazenta-Aktivität ausgegangen werden kann. Die Größe der AL-Gynoeceen war vergleichbar zu Wildtyp-Gynoeceen, was darauf schließen lässt, dass die 12 % größeren Schoten ein Resultat des Wachstums der dichter angelegten Samen ist. *ATML1* ist im Gynoeceum exprimiert (Lu *et al.*, 1996; Swanson *et al.*, 2005). Während der frühen Blütenorganentwicklung nimmt die Expression im Protoderm bzw. in der Epidermis ab und *ATML1* ist hauptsächlich im Plazentagewebe aktiv (Lu *et al.*, 1996). Die Abwesenheit der *ATML1*-Expression in der äußeren Zellschicht der Blütenorgane könnte die unveränderte Größe der Blüten und Gynoeceen erklären und unterstützt die Hypothese, dass die Vergrößerung der Schoten eher durch das Wachstum der dichter angelegten Samen zustande kommt. Durch die Genexpression im

Plazentagewebe lässt sich zudem eine direkte Verbindung zwischen der *pATML1:LOG4*-Expression und der höheren Plazenta-Aktivität herstellen.

Der Mechanismus, mit dem Cytokinin die Plazenta-Aktivität und die Entwicklung der Samenanlagen steuert, ist bisher weitestgehend ungeklärt. STM und WUS, die in Interaktion mit Cytokinin die Aktivität des SAMs regulieren, spielen auch bei der Samenanlagenentwicklung eine Rolle (Skinner *et al.*, 2004). Somit ließe sich ein ähnliches Szenario wie im SAM auch für die Regulation der Plazenta-Aktivität annehmen, in dem STM die Cytokininbiosynthese stimuliert und WUS durch Hemmung von Typ-A-ARR-Genen die Sensitivität der Zellen gegenüber Cytokinin erhöht. Darüber hinaus zeigten Bencivenga *et al.* (2012), dass Cytokinin in Abhängigkeit von den beiden Transkriptionsfaktoren BELL1 (BEL1) und SPOROCTELESS/NOZZLE (SPL/NZZ) die Entwicklung der Samenanlagen durch Regulation von *PIN1*, das für einen Auxin-*efflux-carrier* kodiert, reguliert.

Cytokinin ist ein positiver Regulator der Apikaldominanz (Werner *et al.*, 2003; Müller & Leyser, 2011; Kiba *et al.*, 2013). Entsprechend zeigten AC-Pflanzen eine Reduktion der Apikaldominanz (Abb. 21B), die zwar zu einer Gesamtanzahl an Schoten führte, die vergleichbar mit derjenigen des Wildtyps war (Abb. 21E), den Ertragsverlust aber nicht kompensieren konnte (Abb. 22A). AC-Schoten waren kleiner als beim Wildtyp und enthielten weniger und größere Samen (Abb. 22B-F).

Die drei Cytokininrezeptorgene *CRE1/AHK4*, *AHK2* und *AHK3* sind während aller Stadien der Samenanlagenentwicklung exprimiert, wobei die Expression von *CRE1/AHK4* auf die Chalaza und die Integumente begrenzt ist (Bencivenga *et al.*, 2012). Rezeptordreifachmutanten zeigen eine verminderte Fertilität und produzieren abhängig von den verwendeten mutanten Allelen nur wenige oder sogar gar keine Samen (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Riefler *et al.*, 2006). Die Gründe dafür sind zum einen eine starke Reduktion der Anzahl an Samenanlagen, zum anderen ein Entwicklungsarrest des weiblichen Gametophyten (Bencivenga *et al.*, 2012). Auch bei anderen stark cytokinindefizienten Pflanzen, wie z. B. *CKX*-Überexprimierern, sind die Schoten nicht komplett gefüllt und es werden weniger Samenanlagen als beim Wildtyp gebildet (Werner *et al.*, 2003). AC-Schoten waren hingegen ebenso gleichmäßig gefüllt wie Wildtyp-Schoten (Abb. 22E); die *pATML1:CKX1-4xMyc*-Expression führt demnach nicht zu so starken Defekten wie in *AHK*-Dreifachmutanten und *CKX*-überexprimierenden Pflanzen. Allerdings enthalten AC-Schoten ebenfalls weniger Samen (Abb. 22F), was auf eine geringere Plazenta-Aktivität hindeutet.

Ein weit verbreitetes Phänomen bei cytokinindefizienten Pflanzen ist die Größenzunahme der Embryos und damit der Samen, so z. B. bei *ahp1,2,3,4,5* (Hutchison *et al.*, 2006), *arr1,10,12* (Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008), *cre1 ahk2 ahk3* (Riefler *et al.*, 2006), *log1,2,3,4,5,7,8* (Tokunaga *et al.*, 2012), *p35S:ARR1-SRDX* (Heyl *et al.*, 2008) und *p35S:CKX* (Werner *et al.*, 2003). Die Samengröße wird hauptsächlich durch das anfängliche Endospermwachstum beeinflusst und weniger durch das spätere Embryowachstum (Sundaresan, 2005; Mizutani *et al.*, 2010; Li & Li, 2016), was darauf hindeuten könnte, dass weniger die größeren Embryos, sondern vielmehr ein vergrößertes Endosperm, das als Nähr-

gewebe für den Embryo dient, die Vergrößerung der Samen in cytokinindefizienten Pflanzen verursacht. Riefler *et al.* (2006) führten reziproke Kreuzungen zwischen der Rezeptordreifachmutante und Wildtyp-pflanzen durch und stellten fest, dass der endospermale bzw. maternale Genotyp und nicht der Genotyp des Embryos für die vergrößerten Samen von *cre1 ahk2 ahk3* verantwortlich ist. In der Tat scheint Cytokinin ein negativer Regulator der Endospermentwicklung zu sein: Li *et al.* (2013) zeigten, dass der WRKY-Transkriptionsfaktor MINISEED 3 (MINI3) die Expression von *CKX2* aktiviert und auf diese Weise das Endospermwachstum fördert.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Expression von *LOG4* und *CKX1* in der Plazenta die Anzahl der Samenanlagen und damit den Ertrag beeinflusst. Die höhere bzw. geringere Anzahl an Samenanlagen in AL- bzw. AC-Pflanzen führt zur Ausbildung größerer bzw. kleinerer Schoten. Die größeren Samen von AC-Pflanzen resultieren wahrscheinlich aus einem verstärkten Endospermwachstum.

4.1.3. Auswirkungen der *pATML1*-gesteuerten *LOG4*- und *CKX1*-Expression auf das Wurzelwachstum

Die Reduktion des Cytokininstatus in der Wurzel resultiert in einer verstärkten Wurzelelongation, einer höheren Anzahl an Lateralwurzeln und einem vergrößerten Wurzelapikalmeristem (*root apical meristem*, RAM) (Werner *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2005; Miyawaki *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006). Da der *ATML1*-Promotor nicht nur im Spross, sondern zudem in der Wurzel aktiv ist, wurde der Einfluss der *pATML1:LOG4*- und *pATML1:CKX1*-Expression auf das Wurzelwachstum untersucht. Der *ATML1*-Promotor ist in der Primärwurzel in der Epidermis der Wurzelhaube und im Bereich des Meristems exprimiert (Sessions *et al.*, 1999) sowie in der Epidermis von Lateralwurzelprimordien und auswachsender Seitenwurzeln, wobei auch hier die Expression in der Spitze dominiert (Abb. 13) (Sessions *et al.*, 1999). Um das Wurzelwachstum der AL- und AC-Linien zu charakterisieren, wurde die Länge der Primärwurzel sowie die Anzahl und Dichte der Lateralwurzeln bestimmt.

Im Einklang mit der Rolle von Cytokinin in der Wurzel bildeten die AC-Linien längere Primärwurzeln (Abb. 10B) und eine höhere Anzahl an Seitenwurzeln (Abb. 15D), verbunden mit einem verringerten Seitenwurzelabstand (Abb. 15F). Die Länge der Primärwurzel und die Anzahl an Seitenwurzeln war in der das Transgen stärker exprimierenden Linie #32 (Abb. 8C) ähnlich stark beeinflusst wie in *p35S:CKX1*-Pflanzen, während diese Effekte in der schwächeren Linie #37 etwas weniger stark ausgeprägt waren. Die zu *p35S:CKX1*-Pflanzen vergleichbaren Effekte lassen auf ein vergrößertes RAM und eine geringere Hemmung des für die Lateralwurzelbildung notwendigen Auxinflusses schließen (Werner *et al.*, 2003; Laplaze *et al.*, 2007; Dello Iorio *et al.*, 2008; Marhavý *et al.*, 2014). Cytokinin reguliert die RAM-Größe, indem es die Zellteilung im ruhenden Zentrum inhibiert und die Zelldifferenzierung in der Transitions- und Elongationszone fördert (Dello Iorio *et al.*, 2007; 2008; Zhang *et al.*, 2011; 2013b). Die Hemmung der Seitenwurzelbildung durch Cytokinin erfolgt in frühen Stadien der Lateralwurzelentwicklung (Laplaze *et*

al., 2007; Bielach *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2013; Marhavý *et al.*, 2014). Damit wird *CKX1* in den AC-Linien genau in den Bereichen exprimiert, in denen diese Prozesse reguliert werden (Abb. 13). Dies könnte auch eine Erklärung für den starken Effekt der *pATML1:CKX1-4xMyc*-Expression auf Primärwurzellänge und Seitenwurzelbildung im Vergleich zur *p35S:CKX1*-Expression sein.

Exogene Cytokininapplikation inhibiert die Elongation der Hauptwurzel und die Lateralwurzelbildung (Li *et al.*, 2006; Laplaze *et al.*, 2007). Hinsichtlich der Primärwurzelelongation wurden bei AC- und *p35S:CKX1*-Pflanzen kaum Auswirkungen auf die Sensitivität gegenüber verschiedenen Cytokininkonzentrationen festgestellt (Abb. 15C). Demgegenüber zeigten sich die Linien bei der Seitenwurzelzahl und -dichte resistenter gegenüber Cytokininbehandlung (Abb. 15E, Abb. 15G). Die geringere Cytokinin-sensitivität der *CKX1*-überexprimierenden Pflanzen zeigt, dass die inhibierende Wirkung von Cytokinin auf das Wurzelwachstum durch die *CKX1*-Aktivität abgeschwächt wird.

Für viele von Cytokinin beeinflusste Prozesse lässt sich eine glockenförmige Antwortkurve beobachten, bei der eine Konzentration ober- und unterhalb eines bestimmten Optimums eine zunehmende Hemmung des betrachteten Sachverhalts bewirkt. Ferreira & Kieber (2005) stellten die Hypothese auf, dass der endogene Cytokininstatus in der Wurzel supraoptimal ist und eine geringfügige Reduktion das Wurzelwachstum verstärkt, während eine stärkere Verringerung oder eine Erhöhung des Cytokininstatus das Wurzelwachstum beeinträchtigt. Entsprechend bilden Pflanzen mit einem höheren Cytokininstatus, wie z. B. *rock2*, *rock3*, *CKX*- und *Typ-A-ARR*-Mehrfachmutanten, kürzere Wurzeln mit weniger Verzweigungen (Bartrina, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Jensen, 2013). Interessanterweise führte die Expression von *LOG4* unter der Kontrolle des *35S*- bzw. *ATML1*-Promotors hingegen zu einem Wurzelphänotyp, der demjenigen cytokinindefizienter Pflanzen entspricht. Zudem zeigten die Linien (mit Ausnahme von 35L bei der Seitenwurzelbildung) keine Veränderungen der Sensitivität gegenüber exogen appliziertem Cytokinin (Abb. 14C, Abb. 14E, Abb. 14G). Die transgenen Linien bildeten längere Primärwurzeln und mehr Lateralwurzeln, wobei 35L die stärksten und AL #17 die schwächsten Veränderungen aufwies (Abb. 14B, Abb. 14D). Die *LOG*-Überexpressionslinien, die von Kuroha *et al.* (2009) beschrieben wurden, zeigten hingegen keine Veränderungen der Wurzelelongation und produzierten weniger Seitenwurzeln, was aus dem Arrest der Lateralwurzelentwicklung aufgrund abnormaler Zellproliferation in den Primordien resultierte. Damit entspricht der publizierte Wurzelphänotyp eher der Erwartung, da Cytokinin, wie bereits erwähnt, für die Hemmung des Wurzelwachstums bekannt ist (Skoog & Miller, 1957; Li *et al.*, 2006; Laplaze *et al.*, 2007). Über die Gründe der unterschiedlichen Wurzelphänotypen der von Kuroha *et al.* (2009) und der hier beschriebenen 35L-Pflanzen lässt sich nur spekulieren, u. a. dürften die Nutzung verschiedener Pflanzenmedien und die Expressionsstärke des Transgens dabei eine Rolle gespielt haben. Bisher sind keine Daten veröffentlicht, die eine fördernde Wirkung hoher Cytokininkonzentrationen auf das Wurzelwachstum belegen würden.

Während Cytokinine im Spross die Zellteilung anregen, fördern sie in der Wurzel Endoreduplikation und Zelldifferenzierung (Schaller *et al.*, 2014). Der unterschiedliche Effekt von Cytokinin auf Spross und Wurzel ergibt sich zum einen durch die zelltypabhängige Anwesenheit zusätzlicher Zellzyklusregulatoren, zum anderen durch die Modulation der Cytokinineffekte durch andere Faktoren (z. B. Auxin) (Petricka *et al.*, 2012; Vanstraelen & Benková, 2012). Darüber hinaus zeigten Studien mit synchronisierten BY-2-Tabakzellen mit klar definierten Zellzyklusstadien, dass die endogenen Cytokininlevel oszillieren, mit Höhepunkten an bestimmten Phasenübergängen und begleitet von oszillierenden CKX-Leveln, und dass diese Oszillationen für das Voranschreiten des Zellzyklus kritisch sind (Laureys *et al.*, 1999; Hartig & Beck, 2005). Die korrekte zeitliche Regulation und die Amplitude der Cytokininoszillationen bestimmen wesentlich, ob Cytokinin das Fortschreiten des Zellzyklus begünstigt oder hemmt und somit Zellteilung oder Endoreduplikation begünstigt. Möglicherweise führt die Expression von *LOG4* in der Wurzel der untersuchten transgenen Linien zu Störungen dieser Oszillationen, die eine Förderung der Zellteilung anstelle der Endoreduplikation und auf diese Weise das verstärkte Wurzelwachstum bewirken.

4.2. Einfluss von Cytokinin auf Entwicklungsübergänge (Transitionen)

Die Übergänge von juveniler zu adulter vegetativer Phase und von vegetativem zu reproduktivem Wachstum werden durch komplexe genetische Programme reguliert, die durch endogene und exogene Faktoren gesteuert werden. Die Dauer der juvenilen Phase hat einen maßgeblichen Einfluss auf den Blühbeginn, da Pflanzen Blühkompetenz erst mit dem Übergang zur adulten vegetativen Phase erlangen. Viele Regulatoren, die den Übergang zur reproduktiven Entwicklungsphase steuern, spielen auch für die Transition von juveniler zu adulter Phase eine wichtige Rolle (Huijser & Schmid, 2011; Hong & Jackson, 2015; Teotia & Tang, 2015). Cytokinin ist ein positiver Regulator der Blühinitiation, vornehmlich unter SD-Bedingungen (Michniewicz & Kamieńska, 1965; Bartrina, 2006; D'Aloia *et al.*, 2011; Jensen, 2013), wengleich auch ein Einfluss bei langen Fotoperioden festgestellt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde ein von der Fotoperiode unabhängiger Einfluss von Cytokinin auf die Länge der juvenilen Phase aufgedeckt. Bei cytokinindefizienten Pflanzen tritt der verspätete Blühbeginn zudem oft in Verbindung mit einem verlängerten Plastochron auf (Werner *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2004; Hutchison *et al.*, 2006; Miyawaki *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006; Tokunaga *et al.*, 2012). Der Einfluss von Cytokinin auf den Blühzeitpunkt ist also zum einen auf die Regulation der Juvenil-adult-Transition und zum anderen auf die Regulation der Blattbildungsrate zurückzuführen. In Blättern und im SAM ist eine Zunahme der Cytokininlevel festzustellen, wenn unter SD-Bedingungen angezogene *Arabidopsis*-Pflanzen einem Langtag ausgesetzt werden (Corbesier *et al.*, 2003), was die Bedeutung von Cytokinin für die Blühinitiation auch unter induktiven Lichtbedingungen unterstreicht. Cytokinin aktiviert wichtige Blühintegratorgene: das *FLOWERING-LOCUS-T(FT)*-Paralog *TWIN SISTER OF FT (TSF)* und *FD*, das ein

Partnerprotein von FT und TSF kodiert, sowie das *downstream* angesiedelte *SUPPRESSOR-OF-CONSTANS(SOC1)*-Gen (D'Aloia *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Verbindung von Cytokinin zum *age pathway* aufgedeckt, die nicht nur die Länge der juvenilen Phase bestimmt, sondern zudem den Mechanismus, mit dem Cytokinin Einfluss auf den Blühbeginn nimmt, aufklären könnte.

4.2.1. Der Cytokininstatus korreliert negativ mit der Länge der juvenilen vegetativen Phase

Bei der Untersuchung der *pATML1*-Linien zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Cytokininstatus und der Juvenil-adult-Transition sowie dem Blühbeginn, wobei hier der Cytokininstatus der Epidermis selbst keinen maßgeblichen Einfluss hatte (Abb. 28, Abb. 29). AL-Pflanzen produzierten insgesamt weniger Rosettenblätter als der Wildtyp, während AC-Pflanzen eine höhere Blätterzahl aufwiesen (Abb. 29). Da für die *pATML1*-Linien kaum Veränderungen der Blattbildungsrate festzustellen waren (Abb. 17), wurde ein direkter Einfluss der Gesamtblätterzahl auf den Blühbeginn deutlich. Für die unterschiedliche Anzahl an Rosettenblättern bei Blühbeginn war maßgeblich die Länge der juvenilen vegetativen Phase verantwortlich, während die Anzahl der adulten Blätter (mit Ausnahme von AC #32) vergleichbar zu der des Wildtyps war (Abb. 29). Um die bisher unbekannte Rolle von Cytokinin als positivem Regulator der Juvenil-adult-Transition zu verifizieren, wurden weitere Mutanten und transgene Linien mit verändertem Cytokininstatus untersucht. Hierbei zeigte sich eine eindeutige negative Korrelation zwischen dem Cytokininstatus und der Länge der juvenilen vegetativen Phase (Abb. 30). Dies bestätigt die Beobachtung von Kiba *et al.* (2013), dass die *cyp735a1 cyp735a2*-Doppelmutante 29-45 % mehr juvenile Blätter bildet als Wildtyppflanzen, was bedeutet, dass Cytokinindefizienz den Übergang von der juvenilen in die adulte vegetative Phase verzögert.

Als Merkmal für die Bestimmung der Anzahl der juvenilen Blätter wurde die Abwesenheit von Trichomen auf der abaxialen Blattseite herangezogen, da hierdurch – anders als bei den graduellen Veränderungen der Blattform und -größe – eine klare Unterscheidung zu adulten Blättern möglich ist. Epidermale Trichome sind in *Arabidopsis* sowohl auf der Blattoberseite als auch auf der Blattunterseite zu finden. Trichome erscheinen vom ersten Rosettenblatt an auf der adaxialen Blattseite und nehmen im Laufe der Entwicklung von Blatt zu Blatt zu. Adaxiale Trichome dienen als Schutz vor Predatoren, übermäßiger Transpiration und UV-Licht. Die Behandlung von Pflanzen mit BAP stimuliert die Expression vieler Gene, die für Aktivatoren der Trichombildung kodieren, vor allem in Infloreszenzorganen, aber in geringerem Maße auch auf der adaxialen Blattoberfläche (Gan *et al.*, 2007). Dementsprechend produzieren mit BAP behandelte Pflanzen mehr Trichome auf Stengelblättern, Stengeln und Blüten (Maes *et al.*, 2008). Die Überexpression von CKX-Genen inhibiert die Trichominitiation (Werner *et al.*, 2003). Abaxiale Trichome, die erst mit dem Übergang zur adulten vegetativen Phase erscheinen, erfüllen wahrscheinlich einen anderen Zweck und werden in Abhängigkeit vom Alter der Pflanze durch die Aktivität

von SQUAMOSA-PROMOTER-BINDING-PROTEIN-LIKE(SPL)-Transkriptionsfaktoren initiiert (Chien & Sussex, 1996; Telfer *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2010). Die Initiation von abaxialen Trichomen ist zudem unabhängig von durch Cytokinin regulierter Trichomaktivatoren (Yu *et al.*, 2010) und außerdem konnte bei den verschiedenen analysierten Pflanzenlinien auch ein Einfluss auf die Blattform beobachtet werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Cytokinin nicht direkt die Bildung abaxialer Trichome reguliert, sondern indirekt über seine Verbindung zum *age pathway*.

Bei der Untersuchung der *AHK-gain-of-function*-Mutanten *rock2* und *rock3* und den Doppelrezeptor-mutanten *cre1 ahk2*, *cre1 ahk3* und *ahk2 ahk3* konnten AHK2 und AHK3 als Vermittler der cytokinin-abhängigen Regulation des Übergangs von juveniler zu adulter Entwicklungsphase identifiziert werden. *Rock2* wies eine verkürzte juvenile Phase auf, *rock3* hingegen nicht, und der Funktionsverlust von *AHK2* führte nur in Kombination mit *ahk3* zu einer Verlängerung derselben. *CRE1/AHK4* scheint hingegen keine prominente Rolle in diesem Prozess zu spielen, da die juvenile Phase von *cre1 ahk2* und *cre1 ahk3* genauso viele Rosettenblätter umfasste wie die des Wildtyps (Abb. 30). Unklar ist bisher, ob die *rock3*-Mutation möglicherweise schwächer ist als die *rock2*-Mutation und bei *rock3* deshalb hinsichtlich der Juvenil-adult-Transition kein Phänotyp sichtbar war. Allerdings führt sowohl die *rock2*-Mutation als auch die *rock3*-Mutation in unterschiedlichen Geweben zu einer vergleichbaren Verstärkung der transkriptionellen Aktivierung eines pARR5:GUS-Reporters und transgene pAHK3:rock3-Pflanzen, die insgesamt einen ausgeprägteren Phänotyp zeigen als die *rock3*-Mutation im Wildtyphintergrund, bilden genauso wie *rock3* ebenso viele Rosettenblätter wie Col-0 (Jensen, 2013).

Die drei Typ-B-ARR-Doppelmutanten *arr1 arr10*, *arr1 arr12* und *arr10 arr12* produzierten eine zum Wildtyp vergleichbare Anzahl an juvenilen Blättern (Abb. 33A). Aus der Analyse der dreifach homozygoten Linien *arr1 arr10 AL*, *arr1 arr12 AL* und *arr10 arr12 AL* ließ sich allerdings eine Beteiligung von ARR1 an der Regulation des Juvenil-adult-Übergangs folgern.

Yang *et al.* (2011) stellten die Hypothese auf, dass der vegetative Phasenübergang durch mindestens ein Signal initiiert wird, das von Blattprimordien produziert wird und die miR156-Expression reguliert. Die Expressionsmuster von *ANT*- und *ATML1*-Promotor überschneiden sich in den Primordien (Elliott *et al.*, 1996; Sessions *et al.*, 1999). Die höhere Anzahl an juvenilen Blättern bei AC- und pANT:CKX3-Pflanzen lässt vermuten, dass Cytokinin eines dieser Signale sein könnte, allerdings zeigten die durchgeführten Expressionsanalysen und der *Yeast-one-hybrid*-Matrixansatz, dass das Phytohormon die Juvenil-adult-Transition wahrscheinlich eher durch Erhöhung der miR172-Expression fördert (s. Abschnitt 4.2.3.4).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Cytokinin einen von der Fotoperiode unabhängigen Einfluss auf die Anzahl der juvenilen Blätter hat. Dabei korreliert der Cytokininstatus negativ mit der Länge der juvenilen Phase, während die adulte Phase in den meisten untersuchten Mutanten und transgenen Linien unverändert war. Demnach wirkt sich in Pflanzen mit verändertem Cytokininstatus die Länge der juvenilen Phase auf die Gesamtblätterzahl und somit auf den Blühzeitpunkt aus.

4.2.2. Cytokinin beeinflusst die Blühinduktion durch Regulation der Länge der juvenilen Phase und der Blattbildungsrate

Ahk2 ahk3 produzierte unter induktiven Lichtbedingungen signifikant weniger adulte Blätter als der Wildtyp, sodass die Doppelmutante aufgrund der höheren Anzahl an juvenilen Blättern insgesamt auf die gleiche Anzahl an Rosettenblättern kam (Abb. 30A). Die unveränderte Zahl an Rosettenblättern bei *ahk2 ahk3* deckt sich mit Ergebnissen von Higuchi *et al.* (2004) und Nishimura *et al.* (2004). Die *ahk2 ahk3*-Doppelmutante blühte etwas später als der Wildtyp (ca. 1,4 Tage, Abb. 31A), der Plastochronindex war aber unverändert (Abb. 32A) (Higuchi *et al.*, 2004). Unter SD-Bedingungen blühte *ahk2 ahk3* hingegen deutlich später als Col-0 (ca. 18 Tage), was ebenfalls auf eine Verlängerung der juvenilen und zusätzlich der adulten Phase zurückzuführen war; der Plastochronindex war auch hier unverändert (Abb. 30B, Abb. 31B, Abb. 32B). Während *ahk2 ahk3* unter LD-Bedingungen also den längeren Verbleib in der juvenilen Phase durch eine verkürzte adulte Phase zu kompensieren vermag, tritt der Übergang zur reproduktiven Entwicklung unter SD-Bedingungen ebenfalls verspätet ein, was die Rolle von Cytokinin bei der Blühinduktion bei nicht-induktiven Lichtverhältnissen unterstreicht (Michniewicz & Kamieńska, 1965; Bartrina, 2006; D'Aloia *et al.*, 2011; Jensen, 2013).

AC #32 und pANT:CKX3 waren unter den untersuchten Linien die einzigen, die unter LD-Bedingungen mehr adulte Blätter ausbildeten, unter SD-Bedingungen war die Länge der adulten Phase vergleichbar zu Col-0 (Abb. 29, Abb. 30). Zudem konnten für AL #22 unter LD-Bedingungen eindeutige Tendenzen zu einer kürzeren adulten Phase festgestellt werden (Abb. 29, Abb. 33). Dies könnte bedeuten, dass der primordiale Cytokiningehalt in Abhängigkeit einer langen Fotoperiode für die Umwandlung des vegetativen SAMs in ein Infloreszenzmeristem von Bedeutung ist. AHK2 könnte hierbei eine Rolle spielen, da auch *rock2* in vielen Experimenten eine Tendenz zu einer kürzeren adulten Phase zeigte (Abb. 44B, Abb. 46B, Abb. 48B, Abb. 51B). Bisher gibt es allerdings keine Daten, die einen solchen Zusammenhang bestätigen würden, zumal die Expression von *CKX1* unter der Kontrolle des *35S*-Promotors, der ubiquitär im Spross aktiv ist (Benfey & Chua, 1990), keine Verlängerung der adulten Phase bewirkte. Auch bei der jeweils zweiten Linie von AC und AL war dies nicht festzustellen.

Insgesamt zeigte sich unter SD- und LD-Bedingungen eine positive Korrelation zwischen Cytokininstatus und Blühbeginn (Abb. 28, Abb. 31). Michniewicz & Kamieńska zeigten bereits 1965, dass die exogene Cytokininapplikation auf den *Arabidopsis*-Sprossapex die Blühinduktion unter SD-Bedingungen beschleunigt (Michniewicz & Kamieńska, 1965). Cytokininbehandlung induziert den Blühbeginn bei *Arabidopsis* unter SD-Bedingungen durch Aktivierung wichtiger Blühregulatorgene (*TSF*, *FD*, *SOC1*) (D'Aloia *et al.*, 2011). Mehrere *CKX*-Mehrfachmutanten blühen nur unter SD-Bedingungen bis zu zehn Tagen früher als der Wildtyp (Bartrina, 2006). Die in der vorliegenden Arbeit genutzte Quadrupelmutante *ckx3,4,5,6* blühte allerdings auch unter LD-Bedingungen früher. Sie produzierte trotz verkürzter juveniler Phase insgesamt genauso viele Rosettenblätter wie der Wildtyp, sodass der frühere Blühbeginn nur

durch die erhöhte Blattbildungsrate zu erklären ist (Abb. 30, Abb. 31, Abb. 32). *CKX1*-Überexpressionspflanzen sind unter SD-Bedingungen nicht in der Lage, die reproduktive Phase zu erreichen (Abb. 31B) (Jensen, 2013). Unter LD-Bedingungen blühte *p35S:CKX1* später als der Wildtyp, was zum einen aus einer längeren juvenilen Phase, zum anderen aus einem höheren Plastochronindex resultierte (Abb. 30A, Abb. 31A, Abb. 32A). Interessanterweise kann die Expression von *rock2*, nicht aber die Expression von *rock3*, die Fähigkeit von *p35S:CKX1* zur Blühinduktion wiederherstellen (Jensen, 2013). Dies deutet auf eine dominante Rolle von *AHK2* bei der Regulation des Blühbeginns hin.

Die drei Cytokininrezeptoren übernehmen bei der Determination des Blühzeitpunktes verschiedene Funktionen. Die unveränderte Blattbildungsrate der Linien *rock2*, *rock3* und *ahk2 ahk3* zeigte, dass *AHK2* und *AHK3* den Blühbeginn ausschließlich durch die Veränderung der Länge der juvenilen und adulten Phase beeinflussen. Das Blühverhalten von *rock3* war nicht verändert. Bei *rock2* war sowohl die Anzahl der juvenilen als auch die der adulten Blätter reduziert, bei *ahk2 ahk3* war die juvenile Phase verlängert, die Länge der adulten Phase war abhängig von der Länge der Lichtphase. Unter LD-Bedingungen kompensiert der fotoperiodische Signalweg wahrscheinlich den durch den Funktionsverlust von *AHK2* und *AHK3* verursachten längeren Verbleib in der juvenilen Phase, was die Verkürzung der adulten Phase bei *ahk2 ahk3* erklären würde. Unter SD-Bedingungen hatte der Ausfall von *AHK2* und *AHK3* eine Verlängerung der adulten Phase zur Folge, der anscheinend andere regulatorische Signalwege nicht entgegenwirken können. *Cre1 ahk2* blühte unter SD- und LD-Bedingungen später als der Wildtyp, *cre1 ahk3* nur unter SD-Bedingungen. Da sich bei den beiden Doppelmутanten weder die Anzahl der juvenilen Blätter noch die Anzahl der adulten Blätter vom Wildtyp unterschied, kann der verspätete Blühbeginn nur durch den höheren Plastochronindex erklärt werden. Im Gegensatz zu *AHK2* und *AHK3* beeinflusst *CRE1/AHK4* den Blühzeitpunkt demnach durch eine Veränderung der Blattbildungsrate.

In der Kurztagpflanze Reis und der Langtagpflanze *Arabidopsis* sind Blühmechanismen wie der *GIGANTEA-CONSTANS-FLOWERING-LOCUS-T(GI-CO-FT)*-Signalweg konserviert (Park *et al.*, 1999; Samach *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 2002; Hayama *et al.*, 2003; Corbesier *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 2007). Der Typ-B-Responseregulator(RR) *Ehd1* (Early heading date 1) fördert das Blühen unter SD-Bedingungen und induziert die Expression zweier Florigene in Reis: *Hd3a* (*Heading date 3a*) und *RFT1* (*Rice flowering locus T1*) (Doi *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2015). *Ehd1* interagiert mit dem Typ-A-RR *OsRR1*, welcher die Aktivität von *Ehd1* wahrscheinlich hemmt (Cho *et al.*, 2016). In *Arabidopsis* wurden bisher keine *downstream*-Komponenten der Cytokinin-signalkaskade identifiziert, die eine spezifische Rolle bei der Blühinduktion spielen. Um einen eventuellen Einfluss von *ARR1*, *ARR10* und/oder *ARR12* auf die Blühinduktion aufzudecken, wurden die dreifach homozygoten Linien *arr1 arr10 AL*, *arr1 arr12 AL* und *arr10 arr12 AL* analysiert. Das Blühverhalten der drei Typ-B-*ARR*-Doppelmутanten *arr1 arr10*, *arr1 arr12* und *arr10 arr12* unterschied sich unter LD-Bedingungen nicht vom Wildtyp (Abb. 33B). *Arr1 arr10* produzierte als einzige Doppelmутante insgesamt weniger Rosettenblätter, was aus einer kürzeren adulten Phase resultierte

(Abb. 33A). Da auch *arr10 arr12* eine kürzere adulte Phase aufwies, könnte ARR10 möglicherweise ein negativer Regulator des Übergangs zur reproduktiven Phase sein. Es wäre interessant zu untersuchen, ob der Funktionsverlust von *ARR10* ähnlich wie bei *ahk2 ahk3* unter SD-Bedingungen eine Verlängerung der adulten Phase verursacht. Unter LD-Bedingungen bilden *arr1 arr10*- und *arr10 arr12*-Pflanzen zwar insgesamt weniger Blätter, allerdings waren zudem Einflüsse der Typ-B-ARRs auf die Blattbildungsrate erkennbar, sodass die Verkürzung der adulten Phase auch einen Kompensationsmechanismus darstellen könnte. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, ist ARR1 ein positiver Regulator der Juvenil-adult-Transition. Da die *pATML1:LOG4*-Expression nur im *arr10 arr12*-Hintergrund zu einem früheren Blühbeginn führte, ist ARR1 wahrscheinlich auch in den Blühprozess involviert. ARR1 beeinflusst den Blühzeitpunkt durch die Regulation des vegetativen Entwicklungsübergangs und möglicherweise zusätzlich über einen Einfluss auf die Blattbildungsrate.

Die Untersuchung des Blühverhaltens der Cytokininrezeptordoppelmutanten sowie *rock2* und *rock3* bestätigte die prominente Rolle von AHK2 bei der Blühinduktion, AHK3 kommt eine unterstützende Funktion zu. Die beiden Rezeptoren regulieren die Juvenil-adult-Transition und bei nicht-induktiven Lichtverhältnissen zudem den Übergang von vegetativem zu reproduktivem Wachstum. CRE1/AHK4 fördert den Blühbeginn hingegen durch die Erhöhung der Blattbildungsrate. Außerdem beeinflusst ARR1 den Blühbeginn durch Regulation des vegetativen Entwicklungsphasenübergangs.

4.2.3. Cytokinin beeinflusst die Expression von Komponenten des miR156-abhängigen Signalwegs

Die beiden hoch konservierten microRNAs (miRNAs) miR156 und miR172 und ihre jeweiligen Zielgene regulieren die Juvenil-adult-Transition und den Übergang von vegetativem zu reproduktivem Wachstum. MiR156 fördert Juvenilität, indem sie die Expression von elf Mitgliedern der *SPL*-Transkriptionsfaktor-genfamilie inhibieren. MiR172 begünstigt hingegen durch die Hemmung der Expression von *AP2-like*-Transkriptionsfaktorgenen das Adultstadium und den Übergang zur reproduktiven Entwicklung (Huijser & Schmid, 2011; Teotia & Tang, 2015).

Verschiedene Pflanzenlinien mit verringertem Cytokininstatus wurden für Expressionsstudien genutzt, um den beobachteten Einfluss von Cytokinin auf die Juvenil-adult-Transition auch auf molekularer Ebene nachzuweisen. Als Material wurden ganze Rosetten im Kurztag angezogener Pflanzen sowie definierte Rosettenblätter im Langtag angezogener Pflanzen genutzt. Außerdem wurde die Cytokinin-Induzierbarkeit von Komponenten des miR156-abhängigen autonomen Signalwegs in *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen getestet, indem die Kinetik der Genexpression im Tagesverlauf in Reaktion auf die exogene Applikation von Benzyladenin (BA) analysiert wurde. Die erhobenen Expressionsdaten offenbarten, dass Cytokinin die Expression von *MIR172*-Genen fördert und die Transkription von *MIR156*-Genen unterdrückt, allerdings wirkten sich die Veränderungen der Transkriptmengen nur im Falle der *MIR172*-Gene

auch auf die Abundanz der reifen miR172 aus (Abb. 34, Abb. 36, Abb. 40). Bei den getesteten miR156-Zielgenen zeigte sich vor allem eine durch Cytokindefizienz hervorgerufene Erhöhung des Expressionslevels von Genen der *SPL3*-Gruppe (Abb. 35B, Abb. 37A), während unter miR172-Zielgenen nur für *SMZ* ein eindeutiger Trend zu einer höheren Expression zu beobachten war (Abb. 35D, Abb. 37D).

4.2.3.1. Cytokinin hat keinen Einfluss auf die miR156-Abundanz

Die durchgeführten Expressionsstudien zeigten, dass Cytokinin zwar einen Einfluss auf die *MIR156*-Expression hat, auf der Ebene der reifen miR156 konnte allerdings kein Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 34B, Abb. 36A, Abb. 36C, Abb. 40B, Abb. 40C). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Abundanz von pri-miR156a und der reifen miR156 im Wildtyp von Blatt zu Blatt abnimmt (Abb. 36A, Abb. 36C), was die Abnahme mit fortschreitender Pflanzenentwicklung bestätigt (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Die drei anderen in der Einzelblattstudie getesteten *MIR156*-Transkripte (pri-miR156b, pri-miR156c und pri-miR156d) zeigten keine solche Abnahme, was vermuten lässt, dass ein Großteil der reifen miR156 von pri-miR156a (und möglicherweise den nicht getesteten pri-miR156e-h) abstammt. In AC #32 zeigten nur drei von vier getesteten *MIR156*-Genen eine z. T. deutlich höhere Expression, was zeigt, dass Cytokinin nur die Transkription bestimmter Gene beeinflusst.

Die miR156-Abundanz wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Die Transkription der *MIR156*-Gene wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Beispielsweise haben die miR156-Zielgene *SPL9* und *SPL10* einen positiven Effekt auf die *MIR156A*-Expression, während die *MIR156B*-Expression durch *SPL15* inhibiert wird (Wu *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2012). Die Akkumulation von Zucker im Verlauf der Pflanzenentwicklung hat einen negativen Effekt auf die Abundanz von pri-miR156a, pri-miR156c, pri-miR156f und pri-miR156h, aber wirkt sich wiederum nicht auf die Menge an pri-miR156b und pri-miR156d aus (Yang *et al.*, 2013). Zucker beeinflusst die miR156-Abundanz zudem auf posttranskriptioneller Ebene (Yu *et al.*, 2013). An der pri-miRNA-Prozessierung sind außerdem eine Vielzahl an regulatorischen Proteinen beteiligt, die teilweise für bestimmte *MIR*-Gentranskripte spezifisch sind (Zhang *et al.*, 2015a).

Auf welche Weise Cytokinin die *MIR156*-Expression reguliert, kann auf Grundlage der derzeitigen Datenlage nicht geklärt werden. Es wäre interessant zu untersuchen, ob eine durch einen reduzierten Cytokininstatus verringerte T6P-Abundanz für die Reduktion der *MIR156*-Expression verantwortlich sein könnte. Verschiedene T6P-Biosynthesegene werden durch Cytokinin induziert und sind in cytokindefizienten Pflanzen herunterreguliert (Brenner *et al.*, 2005). Trehalosebehandlung führt zu einer teilweisen Reversion der Spross- und Wurzeldefekte cytokindefizienter Pflanzen (Holst, 2009). T6P hat einen negativen Einfluss auf die miR156-Abundanz, da es die *MIR156*-Primärtranskriptmenge auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene verringert (Wahl *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013). Möglicherweise führt Cytokindefizienz zu einer Reduktion des Signalmoleküls, was sich wiederum positiv auf die

MIR156-Transkription auswirkt, auf posttranskriptioneller Ebene aber kompensiert werden kann. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Cytokinin die Juvenil-adult-Transition nicht durch die Regulation der *miR156*-Abundanz beeinflusst.

4.2.3.2. Der Einfluss von Cytokinin auf die *miR172*-Abundanz wird nicht über die Regulation von *SPL9* und *SPL15* erreicht

Die mit fortschreitendem Pflanzenalter abnehmende *miR156*-Abundanz wird von einer Zunahme der *SPL*-Expression begleitet (Cardon *et al.*, 1999; Wu & Poethig, 2006; Shikata *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Bisher veröffentlichte Daten deuten darauf hin, dass *miR156*-Zielgene in erster Linie durch mRNA-Abbau reguliert werden (Rhoades *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005; Schwab *et al.*, 2005; Wu & Poethig, 2006; Franco-Zorrilla *et al.*, 2007; Gandikota *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2013). Xu *et al.* (2016) zeigten allerdings in einer kürzlichen Veröffentlichung, dass die translationale Hemmung von *SPL*-Transkripten wahrscheinlich von größerer Bedeutung ist als bisher angenommen. Die Interpretation der Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptanalysen wird außerdem durch die Tatsache erschwert, dass sich die Zielgene der beiden *miRNAs* auch untereinander kontrollieren und diese zudem unabhängig von den beiden *miRNAs* zusätzlich durch weitere Faktoren reguliert werden (Teotia & Tang, 2015). Zudem sind die meisten *SPL*-Gene im SAM und in jungen Blättern exprimiert, während nur *SPL3* und *SPL9* auch in ausgewachsenen Blättern exprimiert werden (Xu *et al.*, 2016). Da sich die für die Einzelblattstudie verwendeten Pflanzen bereits in der reproduktiven Phase befanden und die Rosettenblätter bereits ausgewachsen waren, könnten sich die Expressionsmuster ebenfalls auf die gemessenen Transkriptabundanzen ausgewirkt haben. Außerdem zeigten Hyun *et al.* (2016), dass die nah verwandten *SPL9* und *SPL15* verschiedene Rollen bei der Blühinduktion spielen (*SPL9* spielt hauptsächlich unter LD-, *SPL15* vor allem unter SD-Bedingungen eine Rolle), sodass die gemessenen *SPL*-Transkriptmengen möglicherweise auch durch die in den Experimenten verwendeten Fotoperioden beeinflusst wurden.

In den Transkriptanalysen in Rosetten und Blättern konnten keine eindeutigen Tendenzen der Expression verschiedener *SPL*-Gene festgestellt werden (Abb. 35A, Abb. 35C, Abb. 37B). Im Induktionsexperiment führte die Cytokininapplikation zu einer starken Erhöhung der *SPL9*-Expression in der ersten Tageshälfte. Die in unbehandelten Pflanzen beobachtete Expressionserhöhung von *SPL15* trat in den cytokininbehandelten Pflanzen verspätet auf und folgte anschließend einem ähnlichen Verlauf wie in der Kontrolle (Abb. 41B). *SPL9* und *SPL15* induzieren die *MIR172B*-Transkription durch direkte Promotorbindung und auch für *SPL2*, *SPL10*, *SPL11* und *SPL13* konnte gezeigt werden, dass sie die *MIR172B*-Expression fördern (Wu *et al.*, 2009; Hyun *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). *SPL9* hat einen positiven Effekt auf die *MIR156A*-Transkription, während die *MIR156B*-Expression durch *SPL15* inhibiert wird (Wu *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2012). Der kurzzeitige Anstieg der *SPL9*-Expression nach der Cytokininbehandlung könnte

darauf hindeuten, dass Cytokinin die Aktivierung von *MIR172*-Genen zumindest teilweise durch Aktivierung der *SPL9*-Transkription erzielt, allerdings wäre dann auch ein positiver Einfluss auf die *MIR156A*-Expression zu erwarten gewesen. Die *MIR156B*-Expression wurde nicht getestet, durch die kurzzeitige Hemmung der *SPL15*-Expression zu Tagesbeginn wäre aber ebenfalls eine höhere *MIR156*-Expression zu erwarten gewesen. Die Cytokininbehandlung hatte eher eine Hemmung der *MIR156*-Expression zur Folge. Zudem besteht keine eindeutige Korrelation zwischen der Transkriptabundanz von *SPL9* und der *MIR172*-Expression und auch bei der Untersuchung der Kreuzungen *rock2 spl9 spl15* und *ahk2 ahk3 spl9 spl15* zeigten sich nur additive Effekte. Da die Expression von *SPL2*, *SPL10*, *SPL11* und *SPL13* im Induktionsversuch nicht analysiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Einfluss von Cytokinin auf die *miR172*-Expression über die Aktivierung einiger dieser *SPL*-Gene geschieht.

4.2.3.3. Cytokinindefizienz verursacht eine Expressionserhöhung von Mitgliedern der *SPL3*-Gruppe

SPL3, *SPL4* und *SPL5* spielen beim vegetativen Phasenübergang und der Blühinduktion wahrscheinlich keine große Rolle und sind vor allem für die Blütenmeristemidentitätstransition wichtig (Galvão *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012a; Porri *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016). Die Expression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* ist in *miR172*-Überexpressionspflanzen und in Mutanten der *miR172*-Zielgene erhöht (Jung *et al.*, 2011), was darauf schließen lässt, dass *miR172* die Mitglieder der *SPL3*-Gruppe positiv reguliert. Im Induktionsexperiment zeigte *SPL5* nach Cytokininbehandlung eine durchweg höhere Expression als in den Kontrollproben, möglicherweise verursacht durch die erhöhte *miR172*-Abundanz. Bei *SPL4* konnte allerdings kein Einfluss von Cytokinin auf die Expression festgestellt werden (Abb. 41A). Die *SPL3*-Transkriptmenge wurde nicht gemessen. Der positive Einfluss von *miR172* auf die Expression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* konnte demnach nicht oder nur teilweise bestätigt werden, was darauf hindeutet, dass Cytokinin seinen Einfluss auf Entwicklungsübergänge eher über andere Komponenten des *age pathway* vermittelt.

Interessanterweise konnte eine Hochregulation von Mitgliedern der *SPL3*-Gruppe (Gandikota *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008) in cytokinindefizienten Linien beobachtet werden (Abb. 35B, Abb. 37A). Auch eine Metaanalyse verfügbarer Expressionsdaten zeigt einen negativen Einfluss von Cytokinin auf *SPL3* und *SPL4* (Bhargava *et al.*, 2013). Die durch Cytokinindefizienz verursachte Verringerung der *miR172*-Abundanz hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Expression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5*. Dies legt die Vermutung nahe, dass Cytokinin die Mitglieder der *SPL3*-Gruppe unabhängig von *miR172* reguliert.

Neben ihrer Rolle bei Pflanzenwachstum und -entwicklung spielen *miR156*-regulierte *SPLs* auch bei Stressantworten eine Rolle. So spielt beispielsweise *SPL3* eine wichtige Rolle bei Phosphatdefizienz (Lei *et al.*, 2016) und *SPL2*, *SPL9* und *SPL11* regulieren die Toleranz gegenüber wiederkehrendem Hitzestress (Stief *et al.*, 2014). Diese Prozesse werden allerdings in Abhängigkeit von *miR156* reguliert (Stief *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2016). Die Gene der *SPL3*-Untergruppe werden auch durch Gibberelline reguliert (Galvão

et al., 2012; Jung *et al.*, 2012a; Porri *et al.*, 2012). Die Analyse der Expression von GA-Biosynthese- und GA-Katabolismusgenen (Abb. 38) sowie die Ergebnisse der Messungen des GA-Gehalts in cytokinindefizienten Linien (Abb. 39, Tab. 28) lassen vermuten, dass die höhere Expression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* das Resultat eines höheren GA-Gehalts in cytokinindefizienten Pflanzen sein könnte (s. Abschnitt 4.2.5).

4.2.3.4. Cytokinin induziert die Expression von miR172, möglicherweise durch direkte Bindung von Typ-B-ARRs an MIR172-Promotoren

Die Primärtranskripte pri-miR172a, pri-miR172b und pri-miR172c sowie die Abundanz der reifen miR172 nehmen im Laufe der Pflanzenentwicklung zu, während sich die Abundanzen von pri-miR172d und pri-miR172e nicht verändern (Aukerman & Sakai, 2003; Jung *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009), was sich auch in den Ergebnissen der Einzelblattexpressionsstudie widerspiegelt (Abb. 36B, Abb. 36D). Die durchgeführten Expressionsstudien offenbarten zudem einen positiven Einfluss von Cytokinin auf die Abundanz von *MIR172*-Transkripten (Abb. 34C, Abb. 34D, Abb. 36B, Abb. 40D, Abb. 40E). Im Gegensatz zu den Ergebnissen für miR156 wirkten sich die Veränderungen der Transkriptmengen auch auf die Abundanz der reifen miR172 aus (Abb. 36D, Abb. 40F). Der Induktionsversuch zeigte, dass die Expression von mindestens drei *MIR172*-Genen (*MIR172B*, *MIR172D* und *MIR172E*) und der reifen miR172 durch Cytokinin stimuliert wird. Die Cytokininbehandlung führte zu einem deutlichen Anstieg der getesteten *MIR172*-Gene, wobei sich die Expressionsänderung im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen nach vier Stunden auf über das Doppelte belief und bis zum Ende des Tages auf das bis zu 17-fache anstieg (Abb. 40D, Abb. 40E). Auch für die reife miR172 konnte ein Expressionsanstieg im Tagesverlauf nach Cytokininapplikation nachgewiesen werden (Abb. 40F).

Die Funktionen von miR156 und miR172 bei der Juvenil-adult-Transition und dem Übergang von vegetativem zu reproduktivem Wachstum sind in vielen Pflanzenspezies konserviert, wie z. B. *Arabidopsis*, Gerste, Mais und Reis (Huijser & Schmid, 2011; Zhu & Helliwell, 2011). Sowohl in Monokotyledonen als auch in Dikotyledonen lässt sich das inverse Expressionsmuster von miR156 und miR172 finden: Die Abundanz von miR156 ist in der frühen Pflanzenentwicklung hoch und nimmt mit zunehmendem Alter der Pflanze ab, während die miR172-Abundanz während der Pflanzenentwicklung zunimmt (Aukerman & Sakai, 2003; Lauter *et al.*, 2005; Chuck *et al.*, 2007a; 2007b; Jung *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009). Die beiden miRNAs werden aber zumindest teilweise unterschiedlich reguliert. Beispielsweise beeinflussen Gibberelline die Entwicklungsübergänge in Reispflanzen unabhängig von miR156 und miR172 (Tanaka, 2012), während GAs die miR172-Expression in *Arabidopsis* regulieren (Galvão *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012). Während in dieser Arbeit ein positiver Einfluss von Cytokinin auf die miR172-Expression gezeigt werden konnte, stellten Liu *et al.* (2009b) fest, dass sich die miR172-Expression in Reiskeimlingen nach Cytokininbehandlung verringerte.

Bereits 15 Minuten nach exogener Applikation von Cytokinin lassen sich starke Veränderungen der Transkriptabundanzen einer Vielzahl von Genen nachweisen (Brenner *et al.*, 2005). Wenngleich im Induktionsexperiment unmittelbar nach Cytokininbehandlung ein Aufwärtstrend der Transkriptmengen der *MIR172*-Gene *MIR172B*, *MIR172D* und *MIR172E* festzustellen war (Abb. 40E), war erst nach etwa vier Stunden eine mehr als zweifache Transkriptzunahme nachzuweisen. Allerdings zeigten sich in den durchgeführten Expressionsstudien meist nur Unterschiede im einstelligen Bereich, was darauf schließen lässt, dass die Expression dieser Gene unter strenger regulatorischer Kontrolle steht. Möglicherweise werden sie aber auch grundsätzlich eher schwach exprimiert. Um die Möglichkeit einer direkten Aktivierung der *MIR172*-Gene durch Typ-B-ARRs zu testen, wurde ein Y1H-Matrixansatz durchgeführt. Dafür wurden die Promotoren der Gene *MIR172B*, *MIR172D* und *MIR172E* verwendet, da diese bereits in den Expressionsanalysen eine cytokininabhängige Regulation zeigten. Als potenzielle Interaktoren wurden Fusionen der Typ-B-ARRs ARR1, ARR2, ARR10-ARR12, ARR14 und ARR18 mit der Hefe-GAL4-Aktivierungsdomäne genutzt. Während für *pMIR172E* keine Interaktion mit Typ-B-ARRs nachweisbar war, war eine Bindung von ARR12 an *pMIR172B* und von ARR1, ARR2 und ARR12 an *pMIR172D* festzustellen (Abb. 43C). Das 220 bp-Promotorfragment von *pARR6* stellte sich leider als schlechte Positivkontrolle heraus, da keine Interaktion zwischen Typ-B-ARRs und *pARR6* nachgewiesen werden konnte, obwohl *pARR6* als einziges Promotorfragment im Test das als ARR-Bindemotiv identifizierte erweiterte *Cytokinin Response Motif* (ECRM) (Sakai *et al.*, 2001; Taniguchi *et al.*, 2007; Ramireddy *et al.*, 2013) enthielt (Abb. 42). Dieses Resultat deckt sich mit Ergebnissen anderer Y1H-Experimente (Pfeifer, 2012) und deutet darauf hin, dass noch weitere Bindemotive existieren könnten (Brenner *et al.*, 2012). Eine Promotordeletionsanalyse könnte über den gebundenen Sequenzabschnitt Auskunft geben.

Die Beteiligung von ARR1 und ARR12 an der Juvenil-adult-Transition wurde bereits durch die Ergebnisse anderer Experimente angedeutet: Aus der Analyse der Linien *arr1 arr10* AL, *arr1 arr12* AL und *arr10 arr12* AL ließ sich eine Beteiligung von ARR1 an der Regulation des Juvenil-adult-Übergangs und der Blühinduktion folgern (s. Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2). Die Expressionsanalyse in ganzen Rosetten zeigte, dass die pri-miR172b-Abundanz in *arr1 arr12* stärker herunterreguliert ist als in *arr1 arr10* (Abb. 34C, Abb. 34D), was auf eine wichtige Rolle von ARR12 in miR172-vermittelten Prozessen hindeuten könnte. Aufgrund der Entdeckung von ARR2 als zusätzlichem Regulator der *MIR172*-Expression (Abb. 43) wäre eine Untersuchung der *arr1 arr2 arr12*-Dreifachmutante interessant. Die Beteiligung weiterer Typ-B-ARRs bei der Regulation der *MIR172*-Expression ist aber natürlich nicht auszuschließen.

Die Typ-B-ARR-Gene *ARR1*, *ARR2*, *ARR10*, *ARR11* und *ARR12* weisen die breitesten Expressionsmuster auf und vermitteln wahrscheinlich den Großteil der Cytokininantworten in der pflanzlichen Entwicklung (Mason *et al.*, 2004; 2005; Yokoyama *et al.*, 2007; Argyros *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008). *ARR13*, *ARR14* und *ARR18-ARR21* sind hauptsächlich in reproduktiven Organen aktiv (Mason *et al.*, 2004; Tajima *et al.*,

2004). Da miR172 auch bei der Blütenentwicklung eine Rolle spielt (Jung *et al.*, 2007; Grigorova *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2014), könnten die übrigen Typ-B-ARRs hierbei möglicherweise von Bedeutung sein.

Die Bindung von Typ-B-ARRs an die Promotoren ihrer Zielgene erfordert die Phosphorylierung eines konservierten Aspartatrestes in der Empfängerdomäne (Hwang & Sheen, 2001; Tanaka *et al.*, 2004; Kieber & Schaller, 2014). Das His-Asp-Phosphotransfersystem zur Signalweiterleitung ist evolutionär konserviert und existiert sowohl in Prokaryoten als auch in diversen eukaryotischen Spezies, u. a. auch in Hefen (Maeda *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1996; Wurgler-Murphy & Saito, 1997). Außerdem können Komponenten der Cytokininsignalkaskade Faktoren des Hefe-Phosphotransfersystems funktionell ersetzen, z. B. zeigten Suzuki *et al.* (1998), dass AHP1 in der Lage ist, eine Histidinphosphotransfer(Hpt)-Hefemutante zu komplementieren. Da in dem Y1H-Matrixansatz ARR-DNA-Interaktionen im Hefesystem nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass zumindest ARR1, ARR2 und ARR12 durch orthologe oder funktionell verwandte Proteine phosphoryliert werden können. Trotz hoher Sequenz-übereinstimmungen in der Typ-B-ARR-Familie ist es möglich, dass aber nicht alle getesteten ARRs in Hefezellen phosphoryliert werden können, sodass möglicherweise einige Interaktionen nicht nachgewiesen werden konnten.

Eine Bindung von Typ-B-ARRs an DNA im heterologen Hefesystem lässt nicht zwangsläufig auch auf eine Interaktion *in planta* schließen. Diese muss noch durch andere Methoden bestätigt werden. Der direkte Weg ist die Durchführung eines ChIPseq-Experiments. Da nach bestimmten DNA-Abschnitten gesucht wird, könnte man den Sequenzierungsschritt allerdings auch durch eine PCR-basierte Methode ersetzen. Ein indirekter Nachweis ist über die Analyse der *MIR172*-Expression in *ARR*-Überexpressionspflanzen möglich. Aufgrund der hochgradigen funktionellen Redundanz ist die Transkriptanalyse in *ARR*-Mutanten weniger sinnvoll, zumal möglicherweise nicht alle beteiligten Typ-B-ARRs identifiziert wurden. Für die Identifizierung des genauen Sequenzabschnitts, an der die Bindung erfolgt, könnte z. B. ein *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) durchgeführt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Cytokinin mehrere *MIR172*-Gene in positiver Weise reguliert und dass sich dies auch auf der Ebene der reifen miR172 zeigt. Verschiedene Experimente lassen eine Beteiligung von AHK2, AHK3, ARR1, ARR2 und ARR12 bei der Regulation der miR172-Expression vermuten. Der Y1H-Matrixansatz zeigte, dass Typ-B-ARRs die *MIR172*-Expression möglicherweise direkt regulieren. Um die Beteiligung dieser Faktoren zu bestätigen, könnte die Durchführung eines Cytokinin-Induktions-experiments mit *ahk2 ahk3* bzw. *arr1 arr2 arr12* Klarheit bringen.

4.2.3.5. Der Einfluss von Cytokinin auf die miR172-Abundanz wirkt sich auf die SMZ-Expression aus

SMZ zeigte in Linien mit einem reduzierten Cytokininstatus meist eine erhöhte Expression (Abb. 35D, Abb. 37D) und gehörte damit neben *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* zu den am stabilsten differenziell regulierten

Genen und korrelierte zudem mit der verringerten miR172-Expression. Anders als bei den übrigen miR172-Zielgenen, die hauptsächlich auf translationaler Ebene reguliert werden, erfolgt die miR172-vermittelte Hemmung der *SMZ*-Expression zumindest teilweise auf post-transkriptioneller Ebene (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004; Lauter *et al.*, 2005; Mathieu *et al.*, 2009). *SMZ* und *AP2* kommt zudem unter den miR172-Zielgenen eine Sonderstellung zu, da sie sich gegenseitig, sich selbst und andere miR172-Zielgene inhibieren, während für die übrigen Zielgene bisher keine Regulation anderer miR172-Zielgene gezeigt werden konnte (Mathieu *et al.*, 2009; Yant *et al.*, 2010).

Microarraydaten (*The DIURNAL project*, <http://diurnal.mocklerlab.org/>) zeigen einen diurnalen Verlauf der *SMZ*-Expression unter LD-Bedingungen mit einem Maximum bei Zeitgeber 15 (Mockler *et al.*, 2007). Dies deckt sich mit dem im Induktionsversuch nachgewiesenen Maximum 14 Stunden nach Beginn der Lichtphase (Abb. 41D), allerdings konnte noch ein weiteres Maximum 30-60 Minuten nach Tagesbeginn beobachtet werden. Die ersten vier Stunden sind im *DIURNAL project* allerdings nicht weiter aufgelöst. *SMZ* zeigte in den ersten vier Stunden nach Cytokininbehandlung eine Reduktion der Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle, anschließend konnte kein Unterschied mehr festgestellt werden (Abb. 41D). Die verringerte Transkriptmenge könnte das Resultat der erhöhten miR172-Expression sein, allerdings wird dies schnell kompensiert, möglicherweise durch die selbstinhibierende Wirkung von *SMZ* oder durch den Einfluss anderer Faktoren, wie z. B. *AP2* (Mathieu *et al.*, 2009). Interessanterweise zeigten Mathieu *et al.* (2009), dass *SMZ* an die Promotoren von *CKX5* und *ARR3* bindet, was auf eine *Feedback*-Regulation von *SMZ* auf die Cytokininaktivität hindeuten könnte.

Für die miR172-Zielgene *AP2*, *SNZ*, *TOE1*, *TOE2* und *TOE3* konnten in Reaktion auf Cytokinindefizienz und die dadurch verringerte miR172-Abundanz keine eindeutigen Expressionsunterschiede festgestellt werden (Abb. 35D, Abb. 35E, Abb. 37C, Abb. 37D). Im Induktionsversuch konnten für *TOE1* und *TOE3* keine starken Expressionsunterschiede zwischen cytokininbehandelten Keimlingen und Kontrollpflanzen gemessen werden, während die Amplitude des diurnalen Verlaufs der *TOE2*-Transkriptabundanz nach Cytokininbehandlung durchweg niedriger ausfiel (Abb. 41C), was aus der stärkeren miR172-Expression resultieren könnte. Die *SNZ*-Transkriptmenge, die in den Kontrollpflanzen bis zum Beginn der Nachtphase kontinuierlich abfiel und anschließend auf den Ursprungswert zurückkehrte, war im Vergleich zur Kontrolle in cytokininbehandelten Pflanzen stets etwas erhöht und zeigte dabei einen ähnlichen Verlauf. Dies ist möglicherweise das Resultat der hemmenden Wirkung von *SMZ* (Mathieu *et al.*, 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass Cytokinindefizienz zu einer erhöhten *SMZ*-Expression führt und dass die Behandlung von Wildtypkeimlingen zumindest eine kurzzeitige Verringerung der Transkription von *SMZ* bewirkt. Da für die anderen miR172-Zielgene kein eindeutiger Einfluss von Cytokinin auf ihre Expression gezeigt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass Cytokinin seinen Einfluss auf die Juvenil-adult-Transition und auf den Übergang zur reproduktiven Entwicklungsphase vor allem über miR172 und *SMZ* vermittelt. Bestätigt wird diese Hypothese durch die Analyse der Hybride von *smz* mit *ahk2 ahk3* und

rock2 (s. Abschnitt 4.2.4.2). Aufgrund des vorwiegend translationalen Einflusses von miR172 auf die Expression ihrer Zielgene und der Regulation durch weitere Faktoren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Expression weiterer miR172-Zielgene durch Cytokinin beeinflusst wird.

4.2.4. Genetische Untersuchung der Interaktion der Cytokinin-Signalkaskade mit dem miR156-abhängigen autonomen Signalweg

Es konnte gezeigt werden, dass Cytokinin die Juvenil-adult-Transition und den Übergang zur reproduktiven Phase durch Aktivierung von *MIR172*-Genen positiv reguliert und dass dies möglicherweise durch direkte Bindung von Typ-B-ARRs an *MIR172*-Promotoren geschieht. Die Cytokininrezeptoren AHK2 und AHK3 spielen bei der Regulation der Entwicklungsübergänge eine wichtige Rolle. Um genetische Interaktionen des Cytokininsignalwegs mit dem miR156-abhängigen autonomen Signalweg aufzudecken, wurden *rock2* und *ahk2 ahk3* mit verschiedenen verfügbaren transgenen Linien und *loss-of-function*-Mutanten gekreuzt und hinsichtlich ihres Transitionsphänotyps untersucht.

4.2.4.1. Cytokinin agiert wahrscheinlich parallel zum miR156-SPL-Modul

Die Expression von *p35S:MIM156* (*MIM156*) und *pSPL9:GFP-rSPL9* (*rSPL9*) bewirkt, dass die transgenen Pflanzen die juvenile Phase überspringen und bereits nach der Bildung von zwei adulten Blättern zu blühen beginnen (Abb. 46B, Abb. 54A) (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Somit konnte die Expression von *rock2* keine zusätzliche Verkürzung der juvenilen Phase bewirken (Abb. 46B, Abb. 54A).

Interessanterweise war der gleichzeitige Funktionsverlust von AHK2 und AHK3 in der Lage, die juvenile Phase von *p35S:MIM156* (*MIM156*) wiederherzustellen, auch wenn sie im Vergleich zum Wildtyp etwas kürzer ausfiel (Abb. 54A). In *MIM156*-Pflanzen wird ein künstliches miR156-Zielgen überexprimiert, was zur Reduktion der miR156-Aktivität führt und dadurch eine Zunahme der *SPL*-Expression bewirkt (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). Die partielle Wiederherstellung der juvenilen Phase von *MIM156* durch Ausfall von AHK2 und AHK3 zeigt, dass Cytokinin bei der Regulation der Juvenil-adult-Transition parallel zu miR156 agiert und ist mit dem Ergebnis im Einklang, dass die miR156-Abundanz nicht durch Cytokinin beeinflusst wird (s. Abschnitt 4.2.3.1). Die cytokininvermittelte Erhöhung der miR172-Abundanz wird wahrscheinlich auch nicht durch Aktivierung von *SPL*-Genen erreicht. Es konnte kein eindeutiger Einfluss von Cytokinin auf die Expression von *SPL*-Genen nachgewiesen werden, für die eine Förderung der miR172-Expression gezeigt ist (s. Abschnitt 4.2.3.2). Zudem zeigen *Arabidopsis*-Expressionsdaten keinen oder einen negativen Einfluss von Cytokinin auf die Expression von *SPL*-Genen (Brenner *et al.*, 2005; Bhargava *et al.*, 2013). Außerdem konnten bei den Kreuzungen *rock2 spl9 spl15* und *ahk2 ahk3 spl9 spl15* nur additive Effekte festgestellt werden: Im genetischen Hintergrund von *spl9 spl15* verkürzte *rock2* die juvenile Phase, während *ahk2 ahk3* zur Bildung einer höheren Anzahl an

juvenilen Blättern führte. Die adulte Phase von *ahk2 ahk3 spl9 spl15* war ebenso verkürzt wie in *ahk2 ahk3* (Abb. 44, Abb. 45). Zhang *et al.* (2015c) zeigten, dass SPLs mit Typ-B-ARRs interagieren. Es ist möglich, dass diese Interaktion für die Aktivierung der *MIR172*-Expression notwendig ist, allerdings ist bisher nur eine Hemmung der Typ-B-ARR-Aktivität durch SPLs dokumentiert (Zhang *et al.*, 2015c).

Unter LD-Bedingungen hat MIM156 den gleichen Phänotyp wie rSPL9 (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Todesco *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu rSPL9 bilden MIM156-Pflanzen unter SD-Bedingungen allerdings ebenfalls keine juvenilen Blätter (Xu *et al.*, 2016), der Phänotyp von MIM156 ist also ungemein stärker als der von rSPL9. Interessanterweise zeigte sich bei *ahk2 ahk3* rSPL9 im Gegensatz zu *ahk2 ahk3* MIM156 kein Einfluss auf die juvenile Phase von rSPL9-Pflanzen. Dies lässt sich nur dadurch erklären, dass die miR156-resistente *SPL9*-Variante, obwohl sie unter der Kontrolle eines nativen Promotorfragmentes stehen sollte, überexprimiert wird. Diese Annahme wird durch Xu *et al.* (2016) gestützt, die ebenfalls eine miR156-resistente *SPL9*-Variante unter der Kontrolle des eigenen Promotors generierten, deren Expression unter LD-Bedingungen eine Reduktion der Anzahl an juvenilen Blättern, aber keinen Wegfall der juvenilen Phase bewirkte. Entweder fehlen bei dem durch Wang *et al.* (2009) klonierten Promotor regulatorische Elemente, die zu einem anderen räumlichen und/oder zeitlichen Expressionsmuster führen, oder aber die Expression des Gens wird durch *p35S* oder einen anderen konstitutiven Promotor angetrieben.

Um die direkte *MIR172*-Aktivierung durch die Cytokininsignalkaskade zu bestätigen, wäre die Analyse von Hybriden von *ahk2 ahk3* und *rock2* mit *spl2,9,10,11,13,15*, in der alle *MIR172*-aktivierenden *SPL*-Gene ausgeschaltet sind, hilfreich. Die Sechsfachmutante hat einen ähnlich drastischen Phänotyp wie miR156-Überexprimierer und verweilt lange in der juvenilen Phase, bis sie schließlich zu blühen beginnt (Xu *et al.*, 2016). Alternativ könnte die *MIR172*-Induzierbarkeit in *spl2,9,10,11,13,15* durch Cytokinin getestet werden. Auf Grundlage der in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse erscheint zunächst die Hypothese, dass Cytokinin parallel zum miR156-SPL-Modul agiert, am wahrscheinlichsten.

Der Blühzeitpunkt der bisher besprochenen Kreuzungen korrelierte meist nicht mit der Anzahl der gebildeten Rosettenblätter (Abb. 44-47, Abb. 54). Die Verhältnisse von Blühzeitpunkt zur Blätterzahl lassen auf einen Einfluss von miR156, *SPL9* und *SPL15* auf die Blattbildungsrate schließen. Tatsächlich ist dies mehrfach dokumentiert (Schwarz *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2011).

4.2.4.2. Cytokinin beeinflusst die Juvenil-adult-Transition durch Hemmung von *SMZ*

Im Induktionsversuch wurde kurz nach der Cytokininbehandlung eine Reduktion der *SMZ*-Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle gemessen, anschließend konnte kein Unterschied mehr festgestellt werden (Abb. 41D). Der Effekt von Cytokinin auf die *SMZ*-Expression deckt sich aber mit den Ergebnissen der vorangegangenen Expressionsanalysen, die eine erhöhte *SMZ*-Genaktivität in cytokinindefizienten

Pflanzen zeigten (Abb. 35D, Abb. 37D). Anders als bei den übrigen miR172-Zielgenen erfolgt die miR172-vermittelte Hemmung der SMZ-Expression zumindest teilweise auf post-transkriptioneller Ebene (Mathieu *et al.*, 2009). Die juvenilen und adulten Blätterzahlen von *rock2 smz* und *ahk2 ahk3 smz* entsprachen denjenigen von *rock2* bzw. *ahk2 ahk3*, was auf eine eindeutige epistatische Beziehung schließen lässt. Die Resultate lassen vermuten, dass Cytokinin seinen Einfluss auf Entwicklungsübergänge u. a. über miR172 und SMZ vermittelt.

SMZ ist ein Blührepressor und reguliert u. a. die Expression von *FT* und *TSF* in Blättern. Auch Cytokinin reguliert die *TSF*-Expression, allerdings in positiver Weise (D'Aloia *et al.*, 2011). SMZ reprimiert in erster Linie die Blühinduktion unter induktiven LD-Bedingungen durch Hemmung des fotoperiodischen Signalwegs, der alleinige *Knockout* von SMZ führt jedoch nicht zu phänotypischen Auswirkungen auf das Blühverhalten (Mathieu *et al.*, 2009). Dies war in einem von zwei durchgeführten Experimenten auch der Fall (Abb. 51, Abb. 52). Die Analyse des Blühzeitpunktes von *rock2 smz* und *ahk2 ahk3 smz* förderte keine eindeutigen epistatischen Beziehungen zutage. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Cytokinin die *TSF*-Aktivierung möglicherweise über die Hemmung von SMZ erreicht.

Die Expression von *TOE3* steigt im Gegensatz zu den übrigen miR172-Zielgenen mit zunehmendem Pflanzenalter an (Jung *et al.*, 2007), was eine weitere Regulation des Gens unabhängig von miR172 nahelegt. Außerdem spielt TOE3 vor allem in der Blütenentwicklung eine Rolle und weniger bei der Regulation von adulter Phase und Blühinitiation (Aukerman & Sakai, 2003; Jung *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2014). Die Analyse von *rock2 toe3* und *ahk2 ahk3 toe3* zeigte, dass Cytokinin seinen Einfluss auf Entwicklungsübergänge nicht durch *TOE3* vermittelt, allerdings kann funktionelle Redundanz unter den miR172-Zielgenen nicht ausgeschlossen werden. Die *toe3*-Mutante bildet insgesamt weniger Rosettenblätter als der Wildtyp, die Anzahl der juvenilen Blätter unterscheidet sich allerdings nicht (Abb. 48B, Abb. 49B). Der Blühzeitpunkt unterscheidet sich kaum vom Wildtyp (Abb. 48C, Abb. 49C) (Jung *et al.*, 2007; 2014), was die eher untergeordnete Rolle von *TOE3* bei der Regulation von Entwicklungsübergängen unterstreicht. Die Anzahl an juvenilen und adulten Blättern und der Blühbeginn entsprachen bei *rock2 toe3* den Werten von *rock2* (Abb. 48B, Abb. 48C). *Ahk2 ahk3 toe3* zeigte hingegen einen Mischphänotyp von *ahk2 ahk3* und *toe3* hinsichtlich der Länge der juvenilen und adulten Phase (Abb. 49B).

Die Expression von *p35S:MIM172* resultiert in einer Verlängerung der juvenilen Phase (Abb. 54A) (Todesco *et al.*, 2010). Der simultane Genverlust von *AHK2* und *AHK3* hatte keine zusätzliche Verlängerung der juvenilen Phase zur Folge, was sich mit den bisherigen Ergebnissen deckt, da eine verringerte *MIR172*-Expression durch Ausfall der beiden Cytokininrezeptoren (Abb. 34C, Abb. 34D) durch die Reduktion der miR172-Aktivität in *MIM172* maskiert wird.

Bei *ahk2 ahk3 MIM172* war die Anzahl an adulten Blättern wie in *ahk2 ahk3* reduziert und auch die Anzahl der juvenilen Blätter entsprach derjenigen der Doppelmutante. Die gleichzeitige Expression von *rock2* und *p35S:MIM172* führte zu einer geringeren Anzahl an juvenilen Blättern im Vergleich zu

MIM172 (Abb. 54A). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Cytokinin unabhängig von miR172 noch über mindestens einen weiteren Weg die Juvenil-adult-Transition und den Übergang zu reproduktivem Wachstum reguliert.

Die Blühzeitpunkte der Linien *rock2* MIM172, MIM172 und *ahk2 ahk3* MIM172 korrelierten weitestgehend mit der Gesamtanzahl an gebildeten Blättern, was mit dem Befund übereinstimmt, dass miR172 anders als miR156 und SPLs keinen Einfluss auf die Blattbildungsrate hat (Schwarz *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2011).

4.2.5. Die Erhöhung des Gibberellin Gehalts und der Expression von SPL-Genen der SPL3-Gruppe in cytokinindefizienten Pflanzen stellt möglicherweise einen Kompensationsmechanismus dar

Mitglieder der SPL3-Gruppe werden in Blättern cytokinindefizienter Pflanzen stärker exprimiert (Abb. 35B, Abb. 37A). Obwohl gezeigt werden konnte, dass miR172 die Mitglieder der SPL3-Gruppe positiv reguliert (Jung *et al.*, 2011), hatte die durch Cytokinindefizienz verursachte Verringerung der miR172-Abundanz keinen negativen Einfluss auf die Expression von SPL3, SPL4 und SPL5. Dies legt die Vermutung nahe, dass Cytokinin die Mitglieder der SPL3-Gruppe unabhängig von miR172 reguliert.

GA fördert die Blühinduktion unter LD- und SD-Bedingungen u. a. durch die Regulation von SPL-Genen in Blättern sowie im SAM (Galvão *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012a; Porri *et al.*, 2012) und die Behandlung von *Arabidopsis*-Pflanzen mit dem GA-Biosynthese-Inhibitor Paclobutrazol supprimiert die SPL3-Transkription (Jung *et al.*, 2012a). Diese Befunde führten zu der Überlegung, dass GA möglicherweise für die stärkere Expression der SPL3-Gruppenmitglieder verantwortlich sein könnte. Tatsächlich zeigte sich, dass die GA-Biosynthesegene *GA3OX1* und *GA20OX2* in AC-Blättern im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert werden, während die für Enzyme des GA-Katabolismus kodierenden Gene *GA2OX1* und *GA2OX2* stark herunterreguliert waren (Abb. 38). Metaanalysen verfügbarer Expressionsdaten bestätigten den negativen Einfluss auf die *GA3OX1*-Expression (Brenner *et al.*, 2012; Bhargava *et al.*, 2013). Zudem zeigten Jasinski *et al.* (2005), dass *GA2OX2* durch exogene Cytokininapplikation sowie durch Induktion eines *IPT*-Gens im SAM und in Blättern induziert wird. Messungen der GA-Metabolite in Rosetten 15 Tage alter Pflanzen zeigten, dass der GA-Gesamtgehalt in cytokinindefizienten Pflanzen erhöht war, während Linien mit höherem Cytokininstatus keine Unterschiede zum Wildtyp zeigten (Tab. 28).

SPL3, SPL4 und SPL5 spielen beim vegetativen Phasenübergang und der Blühinduktion wahrscheinlich keine große Rolle und sind vor allem für die Blütenmeristemidentitätstransition wichtig (Galvão *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012a; Porri *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016). Auch die Beobachtung, dass eine Verringerung des Cytokininstatus eine Erhöhung des GA-Gehalts zur Folge hat, deutet darauf hin, dass hierbei kein blühverwandter Prozess reguliert wird (Matías-Hernández *et al.*, 2016). Cytokinin und GA übernehmen bei der Blühinduktion eine positive regulatorische Rolle (Matías-Hernández *et al.*, 2016), während

die beiden Phytohormone in anderen Entwicklungsprozessen antagonistische Funktionen ausüben, u. a. bei Spross- und Wurzelwachstum, Zelldifferenzierung und Meristemaktivität (Greenboim-Wainberg *et al.*, 2005; Jasinski *et al.*, 2005).

Die Erhöhung des GA-Gehalts und der Expression von *SPL3*-Gruppenmitgliedern könnte mit den Wachstumsprozessen des Blattes in Zusammenhang stehen. GAs regulieren das Blattwachstum, indem sie sowohl Zellteilung als auch Zellexpansion fördern (Peng *et al.*, 1997; Silverstone *et al.*, 1998; Silverstone *et al.*, 2001; Olszewski *et al.*, 2002; Achard *et al.*, 2009). *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* sind zudem für die Ausbildung adulter Blattmerkmale von Bedeutung, wie z. B. abaxiale Trichome, Erhöhung der Zellzahl und Reduktion der Zellgröße (Usami *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016). In cytokinindefizienten Pflanzen, wie z. B. *p35S:CKX* (Werner *et al.*, 2003) und *AC*, wird die geringere Zellteilungsaktivität partiell durch eine verstärkte Zellexpansion kompensiert (s. Abschnitt 4.1.2.1). Möglicherweise hängt die Erhöhung des GA-Gehalts und der Expression von *SPL3*-Gruppenmitgliedern mit der Kompensation der durch Cytokinindefizienz verursachten verringerten Zellteilungsaktivität zusammen. Dabei könnte GA für die verstärkte Zellexpansion verantwortlich sein und zusammen mit *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* die Zellteilung verstärken.

Die am C₁₃-Atom hydroxylierten GA-Metabolite GA₁, GA₃, GA₅ und GA₆ sowie die nicht hydroxylierten GA₄ und GA₇ stellen die bioaktiven GA-Formen dar, wobei über ihre jeweiligen Funktionen und ihre Wichtigkeit nicht viel bekannt ist (MacMillan, 2001; Yamaguchi, 2008). In den cytokinindefizienten Linien *ahk2 ahk3* und *AC #32* waren GA₄, GA₅ und GA₆ z. T. stark erhöht, allerdings zeigte GA₄ auch in *rock2* und *AL #22* eine höhere Abundanz im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 39B, Abb. 39C). Zwischen der Konzentration von GA₇ und dem Cytokininstatus zeigte sich eine positive Korrelation, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant (Abb. 39B). Auch GA₁₂ war sowohl in Linien mit einem höheren Cytokininstatus als auch in Linien mit reduziertem Cytokininstatus erhöht (Abb. 39A). GA₁₂ ist die Vorstufe aller Metabolite, die am C₁₃-Atom nicht hydroxyliert sind, einschließlich GA₄ und GA₇. Durch Hydroxylierung von GA₁₂ entsteht außerdem GA₅₃, die Vorstufe aller C₁₃-hydroxylierten Formen (Yamaguchi, 2008). Während in *rock2* und *AL #22* aus dem GA₁₂-Überschuss hauptsächlich GA₄ hergestellt zu werden scheint, entstehen in *ahk2 ahk3* und *AC #32* zusätzlich vermehrt die bioaktiven Formen GA₅ und GA₆.

Die Zunahme von GA₄ in Linien mit höherem CK-Status lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass sich diese Linien stärker als die übrigen Linien kurz vor dem Schossen befanden. GA₄ spielt bei der Regulation der Stengelelongation und der Blühinduktion eine wichtige Rolle. Es akkumuliert kurz vor dem Blühbeginn im Sprossapex, wird aber wahrscheinlich in den Blättern synthetisiert und anschließend zum Sprossapex transportiert (Eriksson *et al.*, 2006). GA₃, GA₄ und GA₇ haben einen positiven Einfluss auf Endoreduplikation und Zellelongation in *Arabidopsis*-Hypokotylen (Gendreau *et al.*, 1999; Saibo *et al.*, 2003). Über die Funktionen von GA₅ und GA₆ ist bisher nichts bekannt.

Die Erhöhung von GA₄ (und GA₇) in den getesteten cytokinindefizienten Linien und die Tatsache, dass GAs die Expression von *SPL3*-Gruppenmitgliedern induzieren, sprechen für die Hypothese, dass

Gibberelline für die verstärkte Zellexpansion verantwortlich sind. GA₄ und GA₇ könnten – wie für Hypokotyle beschrieben – die Endoreduplikation und Zellexpansion stimulieren und dabei womöglich mit weiteren GA-Metaboliten wie GA₅ und GA₆ zusammenwirken.

Um diese Hypothese zu verifizieren, müsste eine Reihe von Experimenten durchgeführt werden, die die Beteiligung von GAs und SPLs an der Kompensation der reduzierten Blattfläche in cytokinindefizienten Pflanzen klären, z. B. Einkreuzen von GA- und *SPL*-Mutanten sowie Zellzyklusreporterlinien, Analyse der Verteilung radioaktiv- oder mit einem Fluorophor markierter GAs und Behandlung cytokinindefizienter Pflanzen mit dem GA-Biosynthese-Inhibitor Paclobutrazol.

4.2.6. Modell und Ausblick

Abb. 55 zeigt den aktuellen Forschungsstand zur Regulation der Juvenil-adult-Transition und des Übergangs zum reproduktiven Wachstum durch den miR156-abhängigen autonomen Signalweg (Teotia & Tang, 2015; Hyun *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016) und integriert die Ergebnisse dieser Arbeit zur Interaktion der Cytokininsignalkaskade mit dem *age pathway*. Die miR156-Abundanz ist zu Beginn der pflanzlichen Entwicklung am höchsten und verringert sich mit zunehmendem Pflanzenalter. Damit nimmt die miR156-vermittelte Hemmung der *SPL*-Expression ab, was in einer Aktivierung der miR172-Expression resultiert. Die Expression der *MIR172*-Gene wird zudem durch Cytokinin induziert. Ein Y1H-Matrixansatz zeigte, dass dies möglicherweise durch direkte Bindung von Typ-B-ARRs an die Promotoren dieser Gene erfolgt, ein *in-vivo*-Nachweis, beispielsweise durch ein ChIPseq-Experiment, steht noch aus. AHK2 und AHK3 sind die vermittelnden Cytokininrezeptoren in diesem Prozess. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die miR172-Zunahme im Verlauf der Pflanzenentwicklung von einer altersabhängigen Zunahme des Cytokininstatus begleitet wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Cytokininsignalkaskade parallel zu miR156, *SPL9* und *SPL15* agiert. Ob Cytokinin möglicherweise andere *SPL*-Gene induziert oder Elemente der Signalkaskade mit den SPLs interagieren, um die *MIR172*-Transkription zu aktivieren, ist bisher nicht geklärt. Die Kreuzung von *ahk2 ahk3* und *rock2* mit einer Sechsfachmutante, in der alle *MIR172*-aktivierenden *SPL*-Gene ausgeschaltet sind (*spl2,9,10,11,13,15*), könnte diese Frage klären. Alternativ könnte die Cytokinin-Induzierbarkeit von *MIR172*-Genen in *spl2,9,10,11,13,15* getestet werden.

Der miR172-Anstieg im Laufe der Pflanzenentwicklung führt zur Hemmung der Expression einer Familie aus *AP2-like*-Genen, die für Blührepressoren kodieren. Die Resultate dieser Arbeit lassen vermuten, dass Cytokinin seinen Einfluss auf Entwicklungsübergänge über *SMZ* und möglicherweise über weitere miR172-Zielgene vermittelt, während *TOE3*, das hauptsächlich in der Blütenentwicklung eine Rolle spielt, keine Regulation durch Cytokinin erfährt. *SMZ* reguliert u. a. die Expression von *FT* und *TSF*. Der letztgenannte Blühintegrator wird durch Cytokinin induziert, der genaue Mechanismus ist aber bisher nicht geklärt. Es lässt sich spekulieren, dass dies möglicherweise durch die *MIR172*-Aktivierung und die

daraus resultierende Hemmung von *SMZ* erreicht wird. Welche anderen miR172-Zielgene durch Cytokinin reguliert werden, muss noch untersucht werden, z. B. durch Kreuzungen von *rock2* und *ahk2 ahk3* mit anderen miR172-Zielgenmutanten.

In cytokinindefizienten Pflanzen waren der GA-Gehalt sowie die Expression von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* erhöht, allerdings ist diese Regulation wahrscheinlich unabhängig von der cytokininabhängigen Regulation der Entwicklungsübergänge und spezifisch für Cytokinindefizienz. Die Expressionsstudien wurden zwar nur mit cytokinindefizienten Pflanzenlinien durchgeführt, allerdings zeigte sich im Induktionsversuch keine eindeutige Korrelation zwischen der durch Cytokinin verursachten Erhöhung der miR172-Abundanz und der Expression der *SPL3*-Gruppenmitglieder. Eine genauere Untersuchung dieses Sachverhalts steht noch aus.

Cytokinin reguliert den Blühzeitpunkt unabhängig von der Fotoperiode durch seinen Einfluss auf die Länge der juvenilen und adulten Phase und die Blattbildungsrate. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Cytokinin die Juvenil-adult-Transition und den Übergang zu reproduktivem Wachstum noch über einen oder mehrere miR172-unabhängige Wege reguliert. Die Verkürzung der juvenilen Phase von MIM172 durch Expression von *rock2* und der ungemein stärkere Effekt von Cytokinin unter SD- als unter LD-Bedingungen deuten darauf hin.

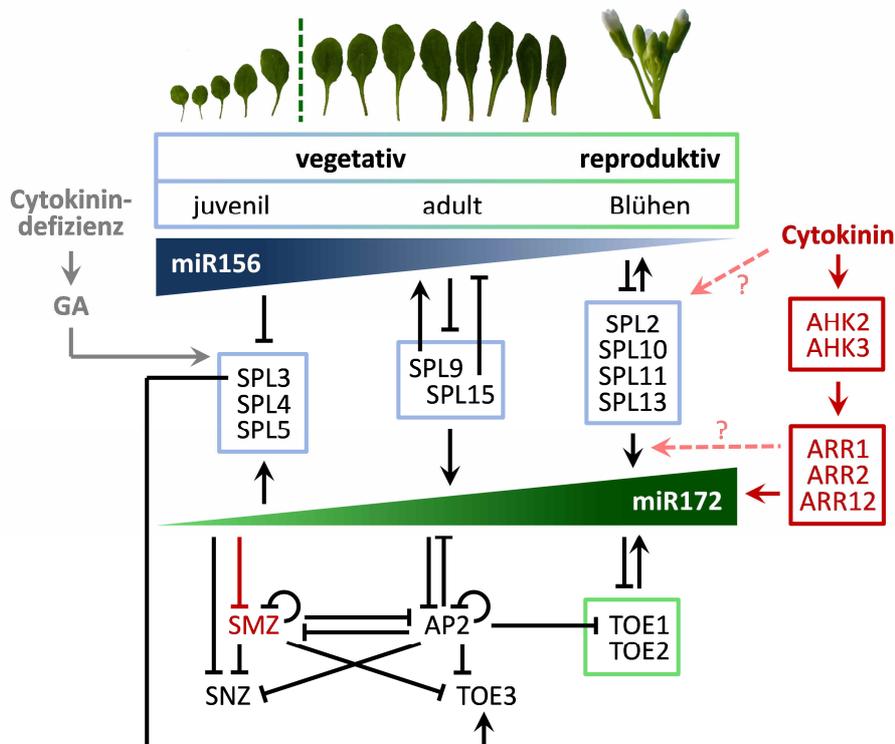


Abb. 55: Modell der Interaktion der Cytokinin-Signalkaskade mit dem *age* pathway. Beschreibung s. Text. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit zur cytokininabhängigen Regulation von Entwicklungsübergängen sind in rot gehalten, gestrichelte Linien deuten auf ungeklärte Interaktionen hin. Die Hypothese zur Kompensation der durch Cytokinindefizienz verursachten Verringerung der Zellteilungsaktivität durch Interaktion von Cytokinin, GA und *SPL3-SPL5* ist in grau dargestellt.

Quellen: Teotia & Tang (2015), Hyun *et al.* (2016), Xu *et al.* (2016).

5. Zusammenfassung

Pflanzen durchlaufen während ihres Lebenszyklus verschiedene Entwicklungsphasen, die durch Ausprägung neuer morphologischer Merkmale und/oder Bildung neuer Organe gekennzeichnet sind. Die Größe und die Anzahl der in der vegetativen Phase gebildeten Blätter werden durch komplexe Netzwerke reguliert, die durch Umwelteinflüsse, genetische Faktoren und Phytohormone beeinflusst werden. Das zellteilungsfördernde Pflanzenhormon Cytokinin (CK) hat einen wesentlichen Einfluss auf die Wachstumsprozesse eines Organs. Ob CK dabei als nicht-zellautonomer Faktor zwischen verschiedenen Zellschichten eines sich entwickelnden Organs vermittelt, ist bisher nicht geklärt. Das Phytohormon ist zudem ein positiver Regulator der Blühinduktion. Da Pflanzen erst mit dem Übergang zur adulten vegetativen Phase Blühkompetenz erlangen, hat die Dauer der juvenilen Phase einen maßgeblichen Einfluss auf den Blühbeginn. Die Juvenil-adult-Transition wird durch die hochkonservierten microRNAs miR156 und miR172 sowie ihre jeweiligen Zielgene reguliert, wobei miR156 Juvenilität und miR172 den Übergang zur adulten und reproduktiven Phase fördert. Über einen Einfluss von CK auf die Juvenil-adult-Transition ist bislang nur sehr wenig bekannt und auch die molekularen Mechanismen, mit denen das Phytohormon Einfluss auf den Blühbeginn nimmt, sind weitestgehend ungeklärt.

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit wurde der Einfluss des epidermalen Cytokininstatus auf das Sprosswachstum untersucht. Dafür wurden mehrere Promotor-Gen-Konstrukte kloniert und in *Arabidopsis* exprimiert. Der in der Epidermis aktive Promotor des *ATML1*-Gens wurde mit Genen kombiniert, welche die Cytokininsignaltransduktion hemmen (*ARR1-SRDX*) bzw. den Katabolismus (*CKX1*) oder die Biosynthese (*LOG4*) von CK fördern. Alle Transgene verursachten Veränderungen des Cytokininstatus, wobei *ARR1-SRDX* lokal in der Epidermis wirkte und *CKX1* und *LOG4* auch Effekte über die Expressionsdomäne hinaus bewirkten. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *pATML1:LOG4* und *pATML1:CKX1-4xMyc* die Größe des vegetativen Meristems beeinflusst, möglicherweise durch die Veränderung des von der L1 ausgehenden Cytokiningradienten. *pATML1:LOG4*-Pflanzen bildeten größere, *pATML1:ARR1-SRDX*- und *pATML1:CKX1*-Pflanzen kleinere Rosettenblätter, die durch Veränderungen der Zellteilungsaktivität bewirkt wurden. Die durch lokale Hemmung der Cytokininsignaltransduktion hervorgerufene Reduktion der epidermalen Zellteilung in *pATML1:ARR1-SRDX* beschränkte das Wachstum der subepidermalen Gewebe. Die Cytokininrezeptoren *AHK2* und *AHK3* sowie der Typ-B-ARR *ARR1* konnten als vermittelnde Faktoren bei der Blattgrößendetermination in den *pATML1*-Linien identifiziert werden. Darüber hinaus konnten Effekte der Transgenexpression auf die Plazenta-Aktivität, die Apikaldominanz, den Stengeldurchmesser und das Wurzelwachstum beobachtet werden.

Die Analyse der *pATML1*-Linien und weiterer *Arabidopsis*-Linien mit verändertem Cytokininstatus im zweiten Teilprojekt förderte eine von der Fotoperiode unabhängige, negative Korrelation zwischen dem Cytokininstatus und der Länge der juvenilen vegetativen Phase zutage, wobei der epidermale Cyto-

kininstatus keinen wesentlichen Einfluss auf die Juvenil-adult-Transition zeigte. AHK2, AHK3 und ARR1 konnten als vermittelnde Faktoren der Cytokininsignalkaskade in diesem Prozess identifiziert werden. Neben der Länge der juvenilen Phase wurde der Blühzeitpunkt zudem durch den Einfluss von CK auf die Blattbildungsrate beeinflusst, wobei dem Rezeptor CRE1/AHK4 hierbei eine wesentliche Rolle zukommt. Expressionsanalysen zeigten, dass der positive Einfluss von CK auf Entwicklungsübergänge durch die transkriptionelle Aktivierung von *MIR172*-Genen zu erklären ist. In einem *Yeast-one-hybrid*-Matrixansatz konnte eine Bindung von ARR1, ARR2 und ARR12 an *MIR172*-Promotoren gezeigt werden, was eine direkte Aktivierung der *MIR172*-Transkription durch Typ-B-ARRs vermuten lässt. Expressionsanalysen und genetische Untersuchungen zeigten zudem, dass CK u. a. eine Hemmung der Expression des miR172-Zielgens *SMZ* bewirkt, welches für einen Blührepressor kodiert, der u. a. die Expression der Florigene *FT* und *TSF* reguliert. Da CK *TSF* in positiver Weise reguliert, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass CK die *TSF*-Aktivierung möglicherweise u. a. über die Hemmung von *SMZ* erreicht.

6. Summary

Plants progress through a number of developmental transitions during their life cycle that are characterized by the development of new morphological traits and/or organs. The number and size of leaves formed during the vegetative phase is regulated by complex regulatory networks which are influenced by environmental cues and genetic factors as well as phytohormones. Cytokinins (CKs), a class of phytohormones which promote cell division, are known to contribute considerably to organ growth. However, it remains unclear whether CKs act as non-cell autonomous factors between different cell layers in developing organs. CKs are also positive regulators of flowering time. As plants acquire the competence to flower upon transition to the adult vegetative phase, the length of the juvenile phase considerably influences flowering time. The juvenile-to-adult phase transition is regulated by the highly conserved microRNAs miR156 and miR172 and their respective target genes. miR156 promotes juvenility, while miR172 stimulates the transition to adult and reproductive growth. The impact of CKs on the juvenile-to-adult phase transition as well as the CK-related molecular mechanisms involved in flowering time determination are still poorly understood.

In the first part of this study, the importance of the epidermal CK status for shoot growth was investigated by using promoter-gene constructs which were stably expressed in *Arabidopsis thaliana*. The epidermis-specific *ATML1* promoter was fused to the ORFs of genes inhibiting CK signal transduction (*ARR1-SRDX*), or promoting the catabolism (*CKX1*) or biosynthesis (*LOG4*) of CKs. The CK status was altered by all transgenes. *ARR1-SRDX* acted locally in the epidermis whereas *CKX1* and *LOG4* also caused effects outside of their expression domain. It was shown that expression of *pATML1:LOG4* and *pATML1:CKX1-4xMyc* influences the size of the vegetative meristem, probably by altering the CK gradient originating from the L1 layer. Compared to the wildtype, rosette leaves of *pATML1:LOG4* plants were bigger and those of *pATML1:ARR1-SRDX* and *pATML1:CKX1* plants were smaller due to changes in cell proliferation activity. In *pATML1:ARR1-SRDX* plants, the reduction of epidermal cell division due to local inhibition of CK signal transduction restricted subepidermal tissue growth. The CK receptors *AHK2* and *AHK3* and type-B-ARR *ARR1* were identified as factors controlling leaf size in *pATML1* lines. Moreover, effects of transgene expression on placenta activity, apical dominance, stem diameter and root growth were observed.

The analysis of *pATML1* lines and additional *Arabidopsis* lines with altered CK status presented in the second part of this study allowed the identification of a photoperiod-independent negative correlation between CK status and length of the juvenile vegetative phase. However, no substantial influence of the epidermal CK status on juvenile-to-adult transition was observed. *AHK2*, *AHK3* and *ARR1* were identified as components of the CK signaling cascade involved in this process. Beside the length of the juvenile phase, flowering time was also affected by the impact of CK on the leaf formation rate, *CRE1/AHK4*

being the crucial player involved. Expression analyses showed that the positive effect of CK on developmental transitions relies on the transcriptional activation of *MIR172*. Using a yeast one-hybrid assay, ARR1, ARR2 and ARR12 were shown to bind to *MIR172* promoters, suggesting direct transcriptional activation of *MIR172* genes by type-B ARRs. Expression analyses and genetic investigations additionally showed that CK inhibits the expression of the miR172 target gene *SMZ* which encodes a flowering repressor regulating the expression of the florigenes *FT* and *TSF*. As CKs positively regulate *TSF*, it can be hypothesized that this activation is achieved by inhibition of *SMZ*.

Literaturverzeichnis

- Abe M, Takahashi T, Komeda Y.** 1999. Cloning and characterization of an L1 layer-specific gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **40**, 571-580.
- Abe M, Takahashi T, Komeda Y.** 2001. Identification of a *cis*-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant Journal* **26**, 487-494.
- Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ.** 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42.
- Achard P, Baghour M, Chapple A, Hedden P, Van Der Straeten D, Genschik P, Moritz T, Harberd NP.** 2007. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *PNAS* **104**, 6484-6489.
- Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beeemster GT, Genschik P.** 2009. Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current Biology* **19**, 1188-1193.
- Aerts S, Van Loo P, Thijs G, Mayer H, De Martin R, Moreau Y, De Moor B.** 2005. TOUCAN 2: the all-inclusive open source workbench for regulatory sequence analysis. *Nucleic Acids Research* **33**, W393-W396.
- Aida M, Vernoux T, Furutani M, Traas J, Tasaka M.** 2002. Roles of *PIN-FORMED1* and *MONOPTEROS* in pattern formation of the apical region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **129**, 3965-3974.
- Alexandre C, Grueneberg DA, Gilman MZ.** 1993. Studying heterologous transcription factors in yeast. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* **5**, 147-155.
- Anastasiou E, Kenz S, Gerstung M, MacLean D, Timmer J, Fleck C, Lenhard M.** 2007. Control of plant organ size by KLUH/CYP78A5-dependent intercellular signaling. *Developmental Cell* **13**, 843-856.
- Andriankaja M, Dhondt S, De Bodt S, Vanhaeren H, Coppens F, De Milde L, Mühlenbock P, Skirydz A, Gonzalez N, Beeemster GTS, Inzé D.** 2012. Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Developmental Cell* **22**, 64-78.
- Argyros RD, Mathews DE, Chiang YH, Palmer CM, Thibault DM, Etheridge N, Argyros DA, Mason MG, Kieber JJ, Schaller GE.** 2008. Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell* **20**, 2102-2116.
- Aukerman MJ, Sakai H.** 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* **15**, 2730-2741.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** 1994. Current protocols in molecular biology. *John Wiley & Sons, New York*.
- Autran D, Jonak C, Belcram K, Beeemster GTS, Kronenberger J, Grandjean O, Inzé D, Traas J.** 2002. Cell numbers and leaf development in *Arabidopsis*: a functional analysis of the *STRUWWELPETER* gene. *EMBO Journal* **21**, 6036-6049.
- Baima S, Nobili F, Sessa G, Lucchetti S, Ruberti I, Morelli G.** 1995. The expression of the *Athb-8* homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**, 4171-4182.
- Barth C, De Tullio M, Conklin PL.** 2006. The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *J Exp Bot* **57**, 1657-1665.
- Bartrina I.** 2006. Molekulare Charakterisierung von *ckx*-Insertionsmutanten und Suppressormutanten des Cytokininfizienzsyndroms in *Arabidopsis thaliana*.

- Bartrina I, Otto E, Strnad M, Werner T, Schmülling T.** 2011. Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 69-80.
- Baumberger N, Baulcombe DC.** 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *PNAS* **102**, 11928-11933.
- Bäurle I, Laux T.** 2003. Apical meristems: the plant's fountain of youth. *Bioessays* **25**, 961-970.
- Beauclair L, Yu A, Bouche N.** 2010. MicroRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **62**, 454-462.
- Beemster GT, De Veylder L, Vercruyse S, West G, Rombaut D, Van Hummelen P, Galichet A, Grissem W, Inzé D, Vuylsteke M.** 2005. Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**, 734-743.
- Bemis SM, Torii KU.** 2007. Autonomy of cell proliferation and developmental programs during *Arabidopsis* aboveground organ morphogenesis. *Developmental Biology* **304**, 367-381.
- Bencivenga S, Simonini S, Benkova E, Colombo L.** 2012. The transcription factors BEL1 and SPL are required for cytokinin and auxin signaling during ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 2886-2897.
- Benfey PN, Chua NH.** 1990. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* **250**, 959-966.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J.** 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Bergmann DC, Sack FD.** 2007. Stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 163-181.
- Bernard P, Couturier M.** 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**, 735-745.
- Bernier G.** 2013. My favourite flowering image: the role of cytokinin as a flowering signal. *J Exp Bot* **64**, 5795-5799.
- Bertani G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293-300.
- Besnard F, Refahi Y, Morin V, Marteaux B, Brunoud G, Chambrier P, Rozier F, Mirabet V, Legrand J, Lainé S, Thévenon E, Farcot E, Cellier C, Das P, Bishopp A, Dumas R, Parcy F, Helariutta Y, Boudaoud A, Godin C, Traas J, Guédon Y, Vernoux T.** 2014a. Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis. *Nature* **505**, 417-421.
- Besnard F, Rozier F, Vernoux T.** 2014b. The AHP6 cytokinin signaling inhibitor mediates an auxin-cytokinin crosstalk that regulates the timing of organ initiation at the shoot apical meristem. *Plant Signal Behav* **9**, e28788.
- Beveridge CA, Murfet IC, Kerhoas L, Sotta B, Miginiac E, Rameau C.** 1997. The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant Journal* **11**, 339-345.
- Bhargava A, Clabaugh I, To JP, Maxwell BB, Chiang YH, Schaller GE, Loraine A, Kieber JJ.** 2013. Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-seq in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **162**, 272-294.
- Bielach A, Podlešáková K, Marhavý P, Duclercq J, Cuesta C, Müller B, Grunewald W, Tarkowski P, Benková E.** 2012. Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in *Arabidopsis* by cytokinin. *Plant Cell* **24**, 3967-3981.
- Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, Riekhof WR, Esparza TJ, Kramer MD, Morris RO.** 2001. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology* **125**, 378-386.

- Birnboim HC, Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.
- Bishop GJ, Harrison K, Jones JDG.** 1996. The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell* **8**, 959-969.
- Bishopp A, Lehesranta S, Vatén A, Help H, El-Showk S, Scheres B, Helariutta K, Mähönen AP, Sakakibara H, Helariutta Y.** 2011a. Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Current Biology* **21**, 927-932.
- Bishopp A, Help H, El-Showk S, Weijers D, Scheres B, Friml J, Benková E, Mähönen AP, Helariutta Y.** 2011b. A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology* **21**, 917-926.
- Blázquez MA, Ahn JH, Weigel D.** 2003. A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **33**, 168-171.
- Bolduc N, Yilmaz A, Mejia-Guerra MK, Morohashi K, O'Connor D, Grotewold E, Hake S.** 2012. Unraveling the KNOTTED1 regulatory network in maize meristems. *Genes Dev* **26**, 1685-1690.
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM.** 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1-20.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM, Simon R.** 2000. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617-619.
- Brenner WG, Romanov GA, Köllmer I, Bürkle L, Schmülling T.** 2005. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant Journal* **44**, 314-333.
- Brenner WG, Ramireddy E, Heyl A, Schmülling T.** 2012. Gene regulation by cytokinin in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **3**, 8.
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O.** 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**, 1185-1190.
- Brownlee BG, Hall RH, Whitty CD.** 1975. 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenine. *Can J Biochem* **53**, 37-41.
- Brzobohatý B, Moore I, Kristoffersen P, Bako L, Campos N, Schell J, Palme K.** 1993. Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051-1054.
- Buechel S, Leibfried A, To JP, Zhao Z, Andersen SU, Kieber JJ, Lohmann JU.** 2010. Role of A-type ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS in meristem maintenance and regeneration. *Eur J Cell Biol* **89**, 279-284.
- Caesar K, Thamm AMK, Witthoft J, Elgass K, Huppenberger P, Grefen C, Horak J, Harter K.** 2011. Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot* **62**, 5571-5580.
- Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P.** 1999. Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* **237**, 91-104.
- Cardon GH, Höhmann S, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P.** 1997. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *Plant Journal* **12**, 367-377.

- Cary AJ, Liu WN, Howell SH.** 1995. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* **107**, 1075-1082.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ.** 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **33**, e179.
- Chen XM.** 2004. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* **303**, 2022-2025.
- Chickarmane VS, Gordon SP, Tarr PT, Heisler MG, Meyerowitz EM.** 2012. Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing *Arabidopsis* shoot meristem. *PNAS* **109**, 4002-4007.
- Chien JC, Sussex IM.** 1996. Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* **111**, 1321-1328.
- Cho HT, Cosgrove DJ.** 2000. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **97**, 9783-9788.
- Cho LH, Yoon J, Pasriga R, An G.** 2016. Homodimerization of Ehd1 is required to induce flowering in rice. *Plant Physiology* **170**, 2159-2171.
- Chouard P.** 1960. Vernalization and its relations to dormancy. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **11**, 191-238.
- Chuck G, Cigan AM, Saeteurn K, Hake S.** 2007a. The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics* **39**, 544-549.
- Chuck G, Meeley R, Irish E, Sakai H, Hake S.** 2007b. The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1*. *Nature Genetics* **39**, 1517-1521.
- Clough SJ, Bent AF.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 735-743.
- Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, Garcia-Lepe R, Lewis MJ, Hedden P.** 1999. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant Journal* **17**, 547-556.
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P.** 1999. Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* **20**, 503-508.
- Corbesier L, Prinsen E, Jacqumard A, Lejeune P, Van Onckelen H, Périlleux C, Bernier G.** 2003. Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J Exp Bot* **54**, 2511-2517.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G.** 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**, 1030-1033.
- Cosgrove DJ.** 2016. Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *J Exp Bot* **67**, 463-476.
- Curaba J, Singh MB, Bhalla PL.** 2014. miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *J Exp Bot* **65**, 1425-1438.
- Cutcliffe JW, Hellmann E, Heyl A, Rashotte AM.** 2011. CRFs form protein-protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain. *J Exp Bot* **62**, 4995-5002.

- Czesnick H, Lenhard M.** 2015. Size control in plants - lessons from leaves and flowers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a019190.
- D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ.** 2000. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology* **124**, 1706-1717.
- D'Aloia M, Bonhomme D, Bouche F, Tamseddak K, Ormenese S, Torti S, Coupland G, Perilleux C.** 2011. Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the *FT* paralogue *TSF*. *Plant Journal* **65**, 972-979.
- Danisman S, Van der Wal F, Dhondt S, Waites R, De Folter S, Bimbo A, Van Dijk AJ, Muino JM, Cutri L, Dornelas MC, Angenent GC, Immink RGH.** 2012. *Arabidopsis* class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically. *Plant Physiology* **159**, 1511-1523.
- Davis AM, Hall A, Millar AJ, Darrah C, Davis SJ.** 2009. Protocol: streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* **5**, 3.
- Day SJ, Lawrence PA.** 2000. Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* **127**, 2977-2987.
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, Van Der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inzé D.** 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1653-1668.
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S.** 2007. Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology* **17**, 678-682.
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S.** 2008. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**, 1380-1384.
- Deng Y, Dong H, Mu J, Ren B, Zheng B, Ji Z, Yang WC, Liang Y, Zuo J.** 2010. *Arabidopsis* histidine kinase CK11 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *Plant Cell* **22**, 1232-1248.
- Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C.** 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *Embo Reports* **8**, 864-870.
- Derrien B, Baumberger N, Schepetilnikov M, Viotti C, De Cillia J, Ziegler-Graff V, Isono E, Schumacher K, Genschik P.** 2012. Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *PNAS* **109**, 15942-15946.
- Disch S, Anastasiou E, Sharma VK, Laux T, Fletcher JC, Lenhard M.** 2006. The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls *Arabidopsis* organ size in a dosage-dependent manner. *Current Biology* **16**, 272-279.
- Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A.** 2004. Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT-like* gene expression independently of Hd1. *Genes Dev* **18**, 926-936.
- Dolan L, Poethig R.** 1998. Clonal analysis of leaf development in cotton. *Am J Bot* **85**, 315-321.
- Domagalska MA, Sarnowska E, Nagy F, Davis SJ.** 2010. Genetic analyses of interactions among gibberellin, abscisic acid, and brassinosteroids in the control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **5**, e14012.
- Dong Z, Han MH, Fedoroff N.** 2008. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate *in vitro* processing of pri-miRNA by DCL1. *PNAS* **105**, 9970-9975.

- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG.** 1999. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Developmental Biology* **215**, 407-419.
- Dortay H, Mehnert N, Bürkle L, Schmülling T, Heyl A.** 2006. Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* **273**, 4631-4644.
- Dortay H, Gruhn N, Pfeifer A, Schwerdtner M, Schmülling T, Heyl A.** 2008. Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *J Proteome Res* **7**, 3649-3660.
- Dugas DV, Bartel B.** 2008. Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Mol Biol* **67**, 403-417.
- Earley KW, Poethig RS.** 2011. Binding of the cyclophilin 40 ortholog SQUINT to Hsp90 protein is required for SQUINT function in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **286**, 38184-38189.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C.** 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**, 1349.
- Efroni I, Blum E, Goldshmidt A, Eshed Y.** 2008. A protracted and dynamic maturation schedule underlies *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* **20**, 2293-2306.
- Efroni I, Eshed Y, Lifschitz E.** 2010. Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. *Plant Cell* **22**, 1019-1032.
- Efroni I, Han SK, Kim HJ, Wu MF, Steiner E, Birnbaum KD, Hong JC, Eshed Y, Wagner D.** 2013. Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Developmental Cell* **24**, 438-445.
- El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y.** 2013. Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**, 1373-1383.
- Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQ, Gerentes D, Perez P, Smyth DR.** 1996. *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**, 155-168.
- Eloy NB, De Freitas Lima M, Van Damme D, Vanhaeren H, Gonzalez N, De Milde L, Hemerly AS, Beemster GT, Inzé D, Ferreira PC.** 2011. The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. *Plant Journal* **68**, 351-363.
- Eloy NB, Gonzalez N, Van Leene J, Maleux K, Vanhaeren H, De Milde L, Dhondt S, Vercruyssen L, Witters E, Mercier R, Cromer L, Beemster GTS, Remaut H, Van Montagu MCE, De Jaeger G, Ferreira PCG, Inzé D.** 2012. SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization. *PNAS* **109**, 13853-13858.
- Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, Nilsson O.** 2006. GA₄ is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell* **18**, 2172-2181.
- Eriksson S, Stransfeld L, Adamski NM, Breuninger H, Lenhard M.** 2010. *KLUH/CYP78A5*-dependent growth signaling coordinates floral organ growth in *Arabidopsis*. *Current Biology* **20**, 527-532.
- Estelle MA, Somerville C.** 1987. Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol Gen Genet* **206**, 200-206.
- Fernández V, Takahashi Y, Le Gourrierc J, Coupland G.** 2016. Photoperiodic and thermosensory pathways interact through CONSTANS to promote flowering at high temperature under short days. *Plant Journal* **86**, 426-440.
- Ferreira FJ, Kieber JJ.** 2005. Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 518-525.
- Fisher K, Turner S.** 2007. PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Current Biology* **17**, 1061-1066.

- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM. 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.
- Fornara F, De Montaigu A, Coupland G. 2010. SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell* **141**, 550.e551-550.e552.
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J. 2007. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics* **39**, 1033-1037.
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T, Frébortová J, Galuszka P. 2011. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot* **62**, 2431-2452.
- Furner IJ, Pumfrey JE. 1992. Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **115**, 755-764.
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev PI, Galuszka P, Klíma P, Gaudinová A, Žižková E, Hanuš J, Dančák M, Trávníček B, Pešek B, Krupička M, Vaňková R, Strnad M, Motyka V. 2011. Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J Exp Bot* **62**, 2827-2840.
- Galbraith DW, Lambert GM, Macas J, Dolezel J. 2001. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Curr Protoc Cytom Chapter 7*, 7.6.1-7.6.22.
- Galichet A, Hoyerova K, Kaminek M, Grisse W. 2008. Farnesylation directs *AtIPT3* subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 1155-1164.
- Galuszka P, Popelková H, Werner T, Frébortová J, Pospíšilová H, Mik V, Köllmer I, Schmölling T, Frébort I. 2007. Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J Plant Growth Regul* **26**, 255-267.
- Galvan-Ampudia CS, Chaumeret AM, Godin C, Vernoux T. 2016. Phyllotaxis: from patterns of organogenesis at the meristem to shoot architecture. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **5**, 460-473.
- Galvão VC, Horrer D, Kuttner F, Schmid M. 2012. Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **139**, 4072-4082.
- Gan Y, Liu C, Yu H, Broun P. 2007. Integration of cytokinin and gibberellin signalling by *Arabidopsis* transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate. *Development* **134**, 2073-2081.
- Gandikota M, Birkenbihl RP, Hohmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P. 2007. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant Journal* **49**, 683-693.
- Gattolin S, Alandete-Saez M, Elliott K, Gonzalez-Carranza Z, Naomab E, Powell C, Roberts JA. 2006. Spatial and temporal expression of the response regulators ARR22 and ARR24 in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **57**, 4225-4233.
- Geisler M, Nadeau J, Sack FD. 2000. Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in *Arabidopsis* are disrupted by the too many mouths mutation. *Plant Cell* **12**, 2075-2086.
- Gendreau E, Orbovic V, Höfte H, Traas J. 1999. Gibberellin and ethylene control endoreduplication levels in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Planta* **209**, 513-516.
- Gietz RD, Woods RA. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**, 87-96.
- Giulini A, Wang J, Jackson D. 2004. Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue ABPHYL1. *Nature* **430**, 1031-1034.

- Goehler H, Lalowski M, Stelzl U, Waelter S, Stroedicke M, Worm U, Droege A, Lindenberg KS, Knoblich M, Haenig C, Herbst M, Suopanki J, Scherzinger E, Abraham C, Bauer B, Hasenbank R, Fritzsche A, Ludewig AH, Bussow K, Coleman SH, Gutekunst CA, Landwehrmeyer BG, Lehrach H, Wanker EE. 2004. A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Molecular Cell* **15**, 853-865.
- Gonzalez N, De Bodt S, Sulpice R, Jikumaru Y, Chae E, Dhondt S, Van Daele T, De Milde L, Weigel D, Kamiya Y, Stitt M, Beemster GTS, Inzé D. 2010. Increased leaf size: different means to an end. *Plant Physiology* **153**, 1261-1279.
- Gonzalez N, Vanhaeren H, Inzé D. 2012. Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in Plant Science* **17**, 332-340.
- Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C, Meyerowitz EM. 2009. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *PNAS* **106**, 16529-16534.
- Grandjean O, Vernoux T, Laufs P, Belcram K, Mizukami Y, Traas J. 2004. *In vivo* analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 74-87.
- Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *PNAS* **87**, 4645-4649.
- Greenboim-Wainberg Y, Maymon I, Borochof R, Alvarez J, Olszewski N, Ori N, Eshed Y, Weiss D. 2005. Cross talk between gibberellin and cytokinin: the *Arabidopsis* GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell* **17**, 92-102.
- Grigg SP, Canales C, Hay A, Tsiantis M. 2005. SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in *Arabidopsis*. *Nature* **437**, 1022-1026.
- Grigorova B, Mara C, Hollender C, Sijacic P, Chen X, Liu Z. 2011. LEUNIG and SEUSS co-repressors regulate miR172 expression in *Arabidopsis* flowers. *Development* **138**, 2451-2456.
- Gruel J, Landrein B, Tarr P, Schuster C, Refahi Y, Sampathkumar A, Hamant O, Meyerowitz EM, Jönsson H. 2016. An epidermis-driven mechanism positions and scales stem cell niches in plants. *Science Advances* **2**, e1500989.
- Guenot B, Bayer E, Kierzkowski D, Smith RS, Mandel T, Žádníková P, Benková E, Kuhlemeier C. 2012. PIN1-independent leaf initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **159**, 1501-1510.
- Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J. 2008. Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* **418**, 1-8.
- Ha CM, Jun JH, Fletcher JC. 2010. Shoot apical meristem form and function. *Curr Top Dev Biol* **91**, 103-140.
- Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. 2012. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science* **17**, 172-179.
- Hamner KC. 1940. Interrelation of light and darkness in photoperiodic induction. *Botanical Gazette* **130**, 808-822.
- Han MH, Goud S, Song L, Fedoroff N. 2004. The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *PNAS* **101**, 1093-1098.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hartig K, Beck E. 2005. Endogenous cytokinin oscillations control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells. *Plant Biology* **7**, 33-40.
- Hartmann J, Stührwohldt N, Dahlke RI, Sauter M. 2013. Phytosulfokine control of growth occurs in the epidermis, is likely to be non-cell autonomous and is dependent on brassinosteroids. *Plant Journal* **73**, 579-590.

- Hay A, Barkoulas M, Tsiantis M.** 2006. ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress *BREVIPEDICELLUS* expression and promote leaf development in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 3955-3961.
- Hay A, Tsiantis M.** 2010. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* **137**, 3153-3165.
- Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K.** 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* **422**, 719-722.
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM.** 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.
- Hejatko J, Ryu H, Kim GT, Dobešova R, Choi S, Choi SM, Souček P, Horak J, Pekarova B, Palme K, Brzobohaty B, Hwang I.** 2009. The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in *Arabidopsis* shoots. *Plant Cell* **21**, 2008-2021.
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM.** 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-832.
- Hellmann E.** 2013. Characterization of mediators of the cytokinin transcriptional response: the characterization of ARR14 and the identification of novel modulators of the cytokinin response.
- Hemerly A, Engler Jde A, Bergounioux C, Van Montagu M, Engler G, Inze D, Ferreira P.** 1995. Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO Journal* **14**, 3925-3936.
- Hemerly AS, Ferreira P, Engler JD, Van Montagu M, Engler G, Inze D.** 1993. *Cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**, 1711-1723.
- Heyl A, Ramireddy E, Brenner WG, Riefler M, Allemeersch J, Schmulling T.** 2008. The transcriptional repressor ARR1-SRDX suppresses pleiotropic cytokinin activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**, 1380-1395.
- Heyl A, Riefler M, Romanov GA, Schmulling T.** 2012. Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *Eur J Cell Biol* **91**, 246-256.
- Heyman J, De Veylder L.** 2012. The anaphase-promoting complex/cyclosome in control of plant development. *Molecular Plant* **5**, 1182-1194.
- Hibara K, Karim MR, Takada S, Taoka K, Furutani M, Aida M, Tasaka M.** 2006. *Arabidopsis* CUP-SHAPED COTYLEDON3 regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation. *Plant Cell* **18**, 2946-2957.
- Higuchi M, Pischke MS, Mahonen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T.** 2004. *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *PNAS* **101**, 8821-8826.
- Hiraguri A, Itoh R, Kondo N, Nomura Y, Aizawa D, Murai Y, Koiwa H, Seki M, Shinozaki K, Fukuhara T.** 2005. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **57**, 173-188.
- Hiratsu K, Matsui K, Koyama T, Ohme-Takagi M.** 2003. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **34**, 733-739.
- Hirose N, Makita N, Yamaya T, Sakakibara H.** 2005. Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology* **138**, 196-206.

- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H.** 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* **59**, 75-83.
- Holst K.** 2009. Untersuchung der Rolle der Cytokinine im Primärmetabolismus und bei der Regulierung der *sink/source*-Verhältnisse in Pflanzen.
- Holst K, Schmölling T, Werner T.** 2011. Enhanced cytokinin degradation in leaf primordia of transgenic *Arabidopsis* plants reduces leaf size and shoot organ primordia formation. *J Plant Physiol* **168**, 1328-1334.
- Hong SY, Kim OK, Kim SG, Yang MS, Park CM.** 2011. Nuclear import and DNA binding of the ZHD5 transcription factor is modulated by a competitive peptide inhibitor in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **286**, 1659-1668.
- Hong Y, Jackson S.** 2015. Floral induction and flower formation - the role and potential applications of miRNAs. *Plant Biotechnol J* **13**, 282-292.
- Horiguchi G, Kim GT, Tsukaya H.** 2005. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **43**, 68-78.
- Horiguchi G, Tsukaya H.** 2011. Organ size regulation in plants: insights from compensation. *Front Plant Sci* **2**, 24.
- Horváth BM, Magyar Z, Zhang YX, Hamburger AW, Bakó L, Visser RG, Bachem CW, Bögre L.** 2006. EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants. *EMBO Journal* **25**, 4909-4920.
- Hosoda K, Imamura A, Katoh E, Hatta T, Tachiki M, Yamada H, Mizuno T, Yamazaki T.** 2002. Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *Plant Cell* **14**, 2015-2029.
- Hothorn M, Dabi T, Chory J.** 2011. Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nature Chem Biol* **7**, 766-768.
- Hou B, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ.** 2004. N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**, 47822-47832.
- Hu Y, Xie Q, Chua NH.** 2003. The *Arabidopsis* auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size. *Plant Cell* **15**, 1951-1961.
- Hu Y, Poh HM, Chua NH.** 2006. The *Arabidopsis* *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth. *Plant Journal* **47**, 1-9.
- Huang H, Nusinow DA.** 2016. Into the evening: complex interactions in the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends in Genetics* **32**, 674-686.
- Huang S, Raman AS, Ream JE, Fujiwara H, Cerny RE, Brown SM.** 1998. Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**, 773-781.
- Hufnagel L, Teleman AA, Rouault H, Cohen SM, Shraiman BI.** 2007. On the mechanism of wing size determination in fly development. *PNAS* **104**, 3835-3840.
- Huijser P, Schmid M.** 2011. The control of developmental phase transitions in plants. *Development* **138**, 4117-4129.
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, Gonzalez M, Lee E, Lewis MW, Maxwell BB, Perdue TD, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ.** 2006. The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **18**, 3073-3087.
- Hwang I, Sheen J.** 2001. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.
- Hwang I, Sheen J, Müller B.** 2012. Cytokinin signaling networks. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 353-380.

- Hyun Y, Richter R, Vincent C, Martinez-Gallegos R, Porri A, Coupland G.** 2016. Multi-layered regulation of SPL15 and cooperation with SOC1 integrate endogenous flowering pathways at the *Arabidopsis* shoot meristem. *Developmental Cell* **37**, 254-266.
- Iki T, Yoshikawa M, Meshi T, Ishikawa M.** 2012. Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO Journal* **31**, 267-278.
- Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T.** 1999. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant and Cell Physiology* **40**, 733-742.
- Imamura A, Kiba T, Tajima Y, Yamashino T, Mizuno T.** 2003. *In vivo* and *in vitro* characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **44**, 122-131.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T.** 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Irish VF, Sussex IM.** 1992. A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem. *Development* **115**, 745-753.
- Ishida K, Yamashino T, Yokoyama A, Mizuno T.** 2008. Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **49**, 47-57.
- Iwakawa HO, Tomari Y.** 2015. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends in Cell Biology* **25**, 651-665.
- Jacqard A, Detry N, Dewitte W, Van Onckelen H, Bernier G.** 2002. *In situ* localisation of cytokinins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral transition. *Planta* **214**, 970-973.
- Jameson PE, Song J.** 2016. Cytokinin: a key driver of seed yield. *J Exp Bot* **67**, 593-606.
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M.** 2005. KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology* **15**, 1560-1565.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW.** 1987. GUS Fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**, 3901-3907.
- Jensen H.** 2013. Molecular characterisation of dominant repressors of the cytokinin deficiency syndrome.
- Jin SH, Ma XM, Kojima M, Sakakibara H, Wang YW, Hou BK.** 2013. Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences *trans*-zeatin homeostasis and *trans*-zeatin responses likely through *O*-glucosylation. *Planta* **237**, 991-999.
- Jofuku KD, Denboer BGW, Vanmontagu M, Okamoto JK.** 1994. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* **6**, 1211-1225.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP.** 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* **14**, 787-799.
- Jorgensen SA, Preston JC.** 2014. Differential *SPL* gene expression patterns reveal candidate genes underlying flowering time and architectural differences in *Mimulus* and *Arabidopsis*. *Mol Phylogenet Evol* **73**, 129-139.

- Jung JH, Seo YH, Seo PJ, Reyes JL, Yun J, Chua NH, Park CM. 2007. The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2736-2748.
- Jung JH, Seo PJ, Kang SK, Park CM. 2011. miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the *SPL3/4/5* genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Mol Biol* **76**, 35-45.
- Jung JH, Ju Y, Seo PJ, Lee JH, Park CM. 2012a. The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **69**, 577-588.
- Jung JH, Seo PJ, Ahn JH, Park CM. 2012b. *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering. *J Biol Chem* **287**, 16007-16016.
- Jung JH, Lee S, Yun J, Lee M, Park CM. 2014. The miR172 target TOE3 represses *AGAMOUS* expression during *Arabidopsis* floral patterning. *Plant Science* **215-216**, 29-38.
- Kakimoto T. 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677-685.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**, 193-195.
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P. 2005. Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* **10**, 103-105.
- Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamaya T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H. 2004. Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **279**, 14049-14054.
- Kawade K, Horiguchi G, Usami T, Hirai MY, Tsukaya H. 2013. *ANGUSTIFOLIA3* signaling coordinates proliferation between clonally distinct cells in leaves. *Current Biology* **23**, 788-792.
- Kazama T, Ichihashi Y, Murata S, Tsukaya H. 2010. The mechanism of cell cycle arrest front progression explained by a *KLUH/CYP78A5*-dependent mobile growth factor in developing leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1046-1054.
- Khan MR, Ai XY, Zhang JZ. 2014. Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**, 347-359.
- Kiba T, Taniguchi M, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T. 1999. Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **40**, 767-771.
- Kiba T, Yamada H, Sato S, Kato T, Tabata S, Yamashino T, Mizuno T. 2003. The type-A response regulator, *ARR15*, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **44**, 868-874.
- Kiba T, Aoki K, Sakakibara H, Mizuno T. 2004. *Arabidopsis* response regulator, *ARR22*, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1063-1077.
- Kiba T, Takei K, Kojima M, Sakakibara H. 2013. Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **27**, 452-461.
- Kieber JJ, Schaller GE. 2014. Cytokinins. *Arabidopsis Book* **12**, e0168.
- Kierzkowski D, Lenhard M, Smith R, Kuhlemeier C. 2013. Interaction between meristem tissue layers controls phyllotaxis. *Developmental Cell* **26**, 616-628.
- Kim HJ, Chiang YH, Kieber JJ, Schaller GE. 2013. *SCF^{KMD}* controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *PNAS* **110**, 10028-10033.

- Kim JH, Kende H.** 2004. A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis*. *PNAS* **101**, 13374-13379.
- Kim JJ, Lee JH, Kim W, Jung HS, Huijser P, Ahn JH.** 2012a. The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **159**, 461-478.
- Kim K, Ryu H, Cho YH, Scacchi E, Sabatini S, Hwang I.** 2012b. Cytokinin-facilitated proteolysis of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2 attenuates signaling output in two-component circuitry. *Plant Journal* **69**, 934-945.
- Kim YJ, Zheng B, Yu Y, Won SY, Mo B, Chen X.** 2011. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal* **30**, 814-822.
- King RW, Hisamatsu T, Goldschmidt EE, Blundell C.** 2008. The nature of floral signals in *Arabidopsis*. I. Photosynthesis and a far-red photoreponse independently regulate flowering by increasing expression of *FLOWERING LOCUS T (FT)*. *J Exp Bot* **59**, 3811-3820.
- Knauer S, Holt AL, Rubio-Somoza I, Tucker EJ, Hinze A, Pisch M, Javelle M, Timmermans MC, Tucker MR, Laux T.** 2013. A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Developmental Cell* **24**, 125-132.
- Ko D, Kang J, Kiba T, Park J, Kojima M, Do J, Kim KY, Kwon M, Endler A, Song WY, Martinoia E, Sakakibara H, Lee Y.** 2014. *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *PNAS* **111**, 7150-7155.
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M.** 2002. *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis* *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant and Cell Physiology* **43**, 1096-1105.
- Köllmer I, Novák O, Strnad M, Schmülling T, Werner T.** 2014. Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX7) from *Arabidopsis* causes specific changes in root growth and xylem differentiation. *Plant Journal* **78**, 359-371.
- Koncz C, Schell J.** 1986. The promoter of T₁-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E.** 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol* **3**, 488-492.
- Köster T, Meyer K, Weinholdt C, Smith LM, Lummer M, Speth C, Grosse I, Weigel D, Staiger D.** 2014. Regulation of pri-miRNA processing by the hnRNP-like protein AtGRP7 in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **42**, 9925-9936.
- Kowalska M, Galuszka P, Frébortová J, Šebela M, Béres T, Hluska T, Šmehilová M, Bilyeu KD, Frébort I.** 2010. Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: Heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry* **71**, 1970-1978.
- Kudo T, Kiba T, Sakakibara H.** 2010. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J Integr Plant Biol* **52**, 53-60.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J.** 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Kurepa J, Wang S, Li Y, Zaitlin D, Pierce AJ, Smalle JA.** 2009. Loss of 26S proteasome function leads to increased cell size and decreased cell number in *Arabidopsis* shoot organs. *Plant Physiology* **150**, 178-189.
- Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y.** 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* **12**, 206-212.

- Kuroha T, Tokunaga H, Kojima M, Ueda N, Ishida T, Nagawa S, Fukuda H, Sugimoto K, Sakakibara H. 2009. Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3152-3169.
- Laplaze L, Benková E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera-Rodriguez MB, Offringa R, Graham N, Doumas P, Friml J, Bogusz D, Beeckman T, Bennett M. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* **19**, 3889-3900.
- Laureys F, Smets R, Lenjou M, Van Bockstaele D, Inzé D, Van Onckelen H. 1999. A low content in zeatin type cytokinins is not restrictive for the occurrence of G₁/S transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters* **460**, 123-128.
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP. 2005. microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *PNAS* **102**, 9412-9417.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA. 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**, 963-967.
- Lee BH, Ko JH, Lee S, Lee Y, Pak JH, Kim JH. 2009a. The *Arabidopsis* GRF-INTERACTING FACTOR gene family performs an overlapping function in determining organ size as well as multiple developmental properties. *Plant Physiology* **151**, 655-668.
- Lee BH, Johnston R, Yang Y, Gallavotti A, Kojima M, Travençolo BAN, Costa LD, Sakakibara H, Jackson D. 2009b. Studies of *aberrant phyllotaxy1* mutants of maize indicate complex interactions between auxin and cytokinin signaling in the shoot apical meristem. *Plant Physiology* **150**, 205-216.
- Lee DJ, Park JY, Ku SJ, Ha YM, Kim S, Kim MD, Oh MH, Kim J. 2007. Genome-wide expression profiling of *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7*(ARR7) overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics* **277**, 115-137.
- Lee H, Yoo SJ, Lee JH, Kim W, Yoo SK, Fitzgerald H, Carrington JC, Ahn JH. 2010. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **38**, 3081-3093.
- Lei KJ, Lin YM, Ren J, Bai L, Miao YC, An GY, Song CP. 2016. Modulation of the phosphate-deficient responses by microRNA156 and its targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **57**, 192-203.
- Leibfried A, To JP, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohmann JU. 2005. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**, 1172-1175.
- Letham DS, Wilson MM, Parker CW, Jenkins ID, Macleod JK, Summons RE. 1975. Regulators of cell division in plant tissues - XXIII. The identity of an unusual metabolite of 6-benzylaminopurine. *Biochim Biophys Acta* **399**, 61-70.
- Letham DS, Palni LMS. 1983. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **34**, 163-197.
- Li A, Mao L. 2007. Evolution of plant microRNA gene families. *Cell Research* **17**, 212-218.
- Li CX, Potuschak T, Colon-Carmona A, Gutiérrez RA, Doerner P. 2005a. *Arabidopsis* TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *PNAS* **102**, 12978-12983.
- Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. 2005b. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Current Biology* **15**, 1501-1507.
- Li J, Nie X, Tan JL, Berger F. 2013. Integration of epigenetic and genetic controls of seed size by cytokinin in *Arabidopsis*. *PNAS* **110**, 15479-15484.
- Li JH, Li YH, Chen SY, An LZ. 2010. Involvement of brassinosteroid signals in the floral-induction network of *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **61**, 4221-4230.

- Li N, Li Y.** 2016. Signaling pathways of seed size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* **33**, 23-32.
- Li S, Yang X, Wu F, He Y.** 2012. HYL1 controls the miR156-mediated juvenile phase of vegetative growth. *J Exp Bot* **63**, 2787-2798.
- Li X, Mo X, Shou H, Wu P.** 2006. Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **47**, 1112-1123.
- Li Y, Zheng L, Corke F, Smith C, Bevan MW.** 2008. Control of final seed and organ size by the *DA1* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **22**, 1331-1336.
- Lindsay DL, Sawhney VK, Bonham-Smith PC.** 2006. Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Science* **170**, 1111-1117.
- Liu D, Song Y, Chen Z, Yu D.** 2009a. Ectopic expression of miR396 suppresses *GRF* target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* **136**, 223-236.
- Liu Q, Zhang YC, Wang CY, Luo YC, Huang QJ, Chen SY, Zhou H, Qu LH, Chen YQ.** 2009b. Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Letters* **583**, 723-728.
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G.** 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal* **28**, 465-474.
- Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt DD, Martin C, Clarke J.** 2006. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *Embo Reports* **7**, 1052-1058.
- Lomin SN, Yonekura-Sakakibara K, Romanov GA, Sakakibara H.** 2011. Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J Exp Bot* **62**, 5149-5159.
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK.** 1996. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.
- Lu PZ, Porat R, Nadeau JA, O'Neill SD.** 1996. Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* **8**, 2155-2168.
- Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Van Dijck P, Stitt M.** 2014. Trehalose metabolism in plants. *Plant Journal* **79**, 544-567.
- Machida S, Chen HY, Yuan YA.** 2011. Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. *Nucleic Acids Research* **39**, 7828-7836.
- MacMillan J.** 2001. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J Plant Growth Regul* **20**, 387-442.
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H.** 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242-245.
- Maes L, Inzé D, Goossens A.** 2008. Functional specialization of the TRANSPARENT TESTA GLABRA1 network allows differential hormonal control of laminal and marginal trichome initiation in *Arabidopsis* rosette leaves. *Plant Physiology* **148**, 1453-1464.
- Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y.** 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* **14**, 2938-2943.
- Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Törmäkangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y.** 2006. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**, 94-98.

- Malamy JE, Benfey PN.** 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33-44.
- Marcotrigiano M.** 2010. A role for leaf epidermis in the control of leaf size and the rate and extent of mesophyll cell division. *Am J Bot* **97**, 224-233.
- Margis R, Fusaro AF, Smith NA, Curtin SJ, Watson JM, Finnegan EJ, Waterhouse PM.** 2006. The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters* **580**, 2442-2450.
- Marhavý P, Duclercq J, Weller B, Feraru E, Bielach A, Offringa R, Friml J, Schwechheimer C, Murphy A, Benková E.** 2014. Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis. *Current Biology* **24**, 1031-1037.
- Marrocco K, Bergdoll M, Achard P, Criqui MC, Genschik P.** 2010. Selective proteolysis sets the tempo of the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 631-639.
- Martin RC, Asahina M, Liu PP, Kristof JR, Coppersmith JL, Pluskota WE, Bassel GW, Goloviznina NA, Nguyen TT, Martínez-Andújar C, Kumar MBA, Pupel P, Nonogaki H.** 2010a. The regulation of post-germinative transition from the cotyledon- to vegetative-leaf stages by microRNA-targeted *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN LIKE13* in *Arabidopsis*. *Seed Science Research* **20**, 89-96.
- Martin RC, Asahina M, Liu PP, Kristof JR, Coppersmith JL, Pluskota WE, Bassel GW, Goloviznina NA, Nguyen TT, Martínez-Andújar C, Kumar MBA, Pupel P, Nonogaki H.** 2010b. The microRNA156 and microRNA172 gene regulation cascades at post-germinative stages in *Arabidopsis*. *Seed Science Research* **20**, 79-87.
- Martínez C, Pons E, Prats G, León J.** 2004. Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant Journal* **37**, 209-217.
- Mason MG, Li J, Mathews DE, Kieber JJ, Schaller GE.** 2004. Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 927-937.
- Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE.** 2005. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 3007-3018.
- Mathieu J, Yant LJ, Mürdter F, Küttner F, Schmid M.** 2009. Repression of flowering by the miR172 target *SMZ*. *PLoS Biology* **7**, e1000148.
- Matías-Hernández L, Aguilar-Jaramillo AE, Cigliano RA, Sanseverino W, Pelaz S.** 2016. Flowering and trichome development share hormonal and transcription factor regulation. *J Exp Bot* **67**, 1209-1219.
- Matsoukas IG.** 2015. Florigens and antiflorigens: a molecular genetic understanding. *Essays in Biochemistry* **58**, 133-149.
- Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K, Kakimoto T.** 2008. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *PNAS* **105**, 20027-20031.
- May P, Liao W, Wu Y, Shuai B, McCombie WR, Zhang MQ, Liu QA.** 2013. The effects of carbon dioxide and temperature on microRNA expression in *Arabidopsis* development. *Nature Communications* **4**, 2145.
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T.** 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
- McGaw BA, Horgan R.** 1983. Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase. *Phytochemistry* **22**, 1103-1105.
- McIlvaine TC.** 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* **49**, 183-186.
- Megraw M, Baev V, Rusinov V, Jensen ST, Kalantidis K, Hatzigeorgiou AG.** 2006. MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. *RNA* **12**, 1612-1619.

- Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW.** 1993. Relationship between endopolyploidy and cell-size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 1661-1668.
- Merchan F, Boualem A, Crespi M, Frugier F.** 2009. Plant polycistronic precursors containing non-homologous microRNAs target transcripts encoding functionally related proteins. *Genome Biology* **10**, R136.
- Mi SJ, Cai T, Hu YG, Chen Y, Hodges E, Ni FR, Wu L, Li S, Zhou H, Long CZ, Chen S, Hannon GJ, Qi YJ.** 2008. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **133**, 116-127.
- Michniewicz M, Kamińska A.** 1965. Flower formation induced by kinetin and vitamin E treatment in long-day plant (*Arabidopsis thaliana*) grown in short day. *Naturwissenschaften* **52**, 623.
- Miller CO, Skoog F, Vonsaltza MH, Strong FM.** 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392-1392.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T.** 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal* **37**, 128-138.
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T.** 2006. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *PNAS* **103**, 16598-16603.
- Mizoguchi T, Wright L, Fujiwara S, Cremer F, Lee K, Onouchi H, Mouradov A, Fowler S, Kamada H, Putterill J, Coupland G.** 2005. Distinct roles of GIGANTEA in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 2255-2270.
- Mizukami Y, Fischer RL.** 2000. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *PNAS* **97**, 942-947.
- Mizutani M, Naganuma T, Tsutsumi K, Saitoh Y.** 2010. The syncytium-specific expression of the *Oryza*;KRP3 CDK inhibitor: implication of its involvement in the cell cycle control in the rice (*Oryza sativa* L.) syncytial endosperm. *J Exp Bot* **61**, 791-798.
- Mockler TC, Michael TP, Priest HD, Shen R, Sullivan CM, Givan SA, McEntee C, Kay SA, Chory J.** 2007. The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**, 353-363.
- Mok DW, Mok MC.** 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 89-118.
- Morcuende R, Bari R, Gibon Y, Zheng WM, Pant BD, Bläsing O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi MK, Stitt M, Scheible WR.** 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant, Cell and Environment* **30**, 85-112.
- Moreira S, Bishopp A, Carvalho H, Campilho A.** 2013. AHP6 inhibits cytokinin signaling to regulate the orientation of pericycle cell division during lateral root initiation. *PLoS One* **8**, e56370.
- Müller B, Sheen J.** 2008. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**, 1094-1097.
- Müller D, Leyser O.** 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany* **107**, 1203-1212.
- Mullis KB, Faloona FA.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.

- Nadeau JA, Sack FD.** 2002. Stomatal development in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* **1**, e0066.
- Nagel DH, Doherty CJ, Pruneda-Paz JL, Schmitz RJ, Ecker JR, Kay SA.** 2015. Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in *Arabidopsis*. *PNAS* **112**, E4802-E4810.
- Nakamura A, Fujioka S, Sunohara H, Kamiya N, Hong Z, Inukai Y, Miura K, Takatsuto S, Yoshida S, Ueguchi-Tanaka M, Hasegawa Y, Kitano H, Matsuoka M.** 2006. The role of *OsBRI1* and its homologous genes, *OsBRL1* and *OsBRL3*, in rice. *Plant Physiology* **140**, 580-590.
- Nakaya M, Tsukaya H, Murakami N, Kato M.** 2002. Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **43**, 239-244.
- Neff MM, Neff JD, Chory J, Pepper AE.** 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant Journal* **14**, 387-392.
- Nieminen K, Immanen J, Laxell M, Kauppinen L, Tarkowski P, Dolezal K, Tähtiharju S, Elo A, Decourteix M, Ljung K, Bhalerao R, Keinonen K, Albert VA, Helariutta Y.** 2008. Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *PNAS* **105**, 20032-20037.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C.** 2004. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1365-1377.
- Nitschke S.** 2014. Novel roles for cytokinin in the responses to high light and circadian stress.
- Nobusawa T, Okushima Y, Nagata N, Kojima M, Sakakibara H, Umeda M.** 2013. Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation. *PLoS Biology* **11**, e1001531.
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, Doležal K, Strnad M.** 2008. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224.
- Nozawa M, Miura S, Nei M.** 2012. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biol Evol* **4**, 230-239.
- O'Brien JA, Benková E.** 2013. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Front Plant Sci* **4**, 451.
- Ogawara T, Higashi K, Kamada H, Ezura H.** 2003. Ethylene advances the transition from vegetative growth to flowering in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* **160**, 1335-1340.
- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H, Ohme-Takagi M.** 2001. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959-1968.
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y.** 1991. Requirement of the auxin polar transport-system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* **3**, 677-684.
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F.** 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14 Suppl**, S61-S80.
- Otto E.** 2013. Der Einfluss von Cytokinin auf die Entwicklung des Sprossmeristems und auf den Ertrag von *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus*.
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D.** 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**, 257-263.
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible WR.** 2008. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant Journal* **53**, 731-738.

- Park DH, Somers DE, Kim YS, Choy YH, Lim HK, Soh MS, Kim HJ, Kay SA, Nam HG. 1999. Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis GIGANTEA* gene. *Science* **285**, 1579-1582.
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS. 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *PNAS* **102**, 3691-3696.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **12**, 1484-1495.
- Pauwels L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inzé D, Goossens A. 2008. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *PNAS* **105**, 1380-1385.
- Peng JR, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP. 1997. The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**, 3194-3205.
- Peterson KM, Rychel AL, Torii KU. 2010. Out of the mouths of plants: the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *Plant Cell* **22**, 296-306.
- Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN. 2012. Control of *Arabidopsis* root development. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 563-590.
- Pfeifer A. 2012. Charakterisierung von *cis*- und *trans*-Faktoren der transkriptionellen Cytokininantwort in *Arabidopsis thaliana*.
- Plíhalová L, Vylíčilová H, Doležal K, Zahajská L, Zatloukal M, Strnad M. 2016. Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnology* **33**, 614-624.
- Poethig RS, Sussex IM. 1985. The cellular parameters of leaf development in tobacco: a clonal analysis. *Planta* **165**, 170-184.
- Poethig RS, Szymkowiak EJ. 1995. Clonal analysis of leaf development in maize. *Maydica* **40**, 67-76.
- Porri A, Torti S, Romera-Branchat M, Coupland G. 2012. Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of *Arabidopsis* under long photoperiods. *Development* **139**, 2198-2209.
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**, 865-875.
- Qin H, Chen F, Huan X, Machida S, Song J, Yuan YA. 2010. Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. *RNA* **16**, 474-481.
- Raines T, Shanks C, Cheng CY, McPherson D, Argueso CT, Kim HJ, Franco-Zorrilla JM, Lopez-Vidriero I, Solano R, Vaňková R, Schaller GE, Kieber JJ. 2016. The cytokinin response factors modulate root and shoot growth and promote leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **85**, 134-147.
- Ramachandran V, Chen X. 2008. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science* **321**, 1490-1492.
- Ramireddy E, Brenner WG, Pfeifer A, Heyl A, Schmölling T. 2013. *In planta* analysis of a *cis*-regulatory cytokinin response motif in *Arabidopsis* and identification of a novel enhancer sequence. *Plant and Cell Physiology* **54**, 1079-1092.
- Rashotte AM, Carson SDB, To JPC, Kieber JJ. 2003. Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**, 1998-2011.

- Rashotte AM, Mason MG, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ. 2006. A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *PNAS* **103**, 11081-11085.
- Rasia RM, Mateos J, Bologna NG, Burdisso P, Imbert L, Palatnik JF, Boisbouvier J. 2010. Structure and RNA interactions of the plant microRNA processing-associated protein HYL1. *Biochemistry* **49**, 8237-8239.
- Reinhardt D, Pesce ER, 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.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* **16**, 1616-1626.
- Ren G, Xie M, Dou Y, Zhang S, Zhang C, Yu B. 2012. Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. *PNAS* **109**, 12817-12821.
- Ren GD, Xie M, Zhang SX, Vinovskis C, Chen XM, Yu B. 2014. Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylates 5' RNA fragments generated by AGO1 cleavage. *PNAS* **111**, 6365-6370.
- Ren MZ, Qiu SQ, Venglat P, Xiang DQ, Feng L, Selvaraj G, Datla R. 2011. Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **155**, 1367-1382.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**, 513-520.
- Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmülling T. 2006. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* **18**, 40-54.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquemard A, Murray JAH. 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.
- Robert HS, Grones P, Stepanova AN, Robles LM, Lokerse AS, Alonso JM, Weijers D, Friml J. 2013. Local auxin sources orient the apical-basal axis in *Arabidopsis* embryos. *Current Biology* **23**, 2506-2512.
- Rodriguez RE, Mecchia MA, Debernardi JM, Schommer C, Weigel D, Palatnik JF. 2010. Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* **137**, 103-112.
- Rogers K, Chen X. 2013. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* **25**, 2383-2399.
- Rojas CA, Eloy NB, Lima Mde F, Rodrigues RL, Franco LO, Himanen K, Beemster GT, Hemerly AS, Ferreira PC. 2009. Overexpression of the *Arabidopsis* anaphase promoting complex subunit CDC27a increases growth rate and organ size. *Plant Mol Biol* **71**, 307-318.
- Romanov GA, Lomin SN, Schmülling T. 2006. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot* **57**, 4051-4058.
- Rose MD, Winston F, Hieter P. 1990. Methods in yeast genetics - a laboratory course manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Rupp HM, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmülling T. 1999. Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant Journal* **18**, 557-563.
- Saibo NJ, Vriezen WH, Beemster GT, Van Der Straeten D. 2003. Growth and stomata development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant Journal* **33**, 989-1000.

- Sakai H, Aoyama T, Oka A.** 2000. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant Journal* **24**, 703-711.
- Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A.** 2001. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* **294**, 1519-1521.
- Sakakibara H.** 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 431-449.
- Sakamoto T, Sakakibara H, Kojima M, Yamamoto Y, Nagasaki H, Inukai Y, Sato Y, Matsuoka M.** 2006. Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiology* **142**, 54-62.
- Sakano Y, Okada Y, Matsunaga A, Suwama T, Kaneko T, Ito K, Noguchi H, Abe I.** 2004. Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* **65**, 2439-2446.
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G.** 2000. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**, 1613-1616.
- Sampedro J, Cosgrove DJ.** 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology* **6**.
- Savaldi-Goldstein S, Peto C, Chory J.** 2007. The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* **446**, 199-202.
- Savaldi-Goldstein S, Chory J.** 2008. Growth coordination and the shoot epidermis. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 42-48.
- Schaller GE, Kieber JJ, Shiu SH.** 2008. Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *Arabidopsis Book* **6**, e0112.
- Schaller GE, Street IH, Kieber JJ.** 2014. Cytokinin and the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* **21**, 7-15.
- Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ.** 2015. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell* **27**, 44-63.
- Schluepmann H, Berke L, Sanchez-Perez GF.** 2012. Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *J Exp Bot* **63**, 3379-3390.
- Schmid M, Uhlentaut NH, Godard F, Demar M, Bressan R, Weigel D, Lohmann JU.** 2003. Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* **130**, 6001-6012.
- Scholl RL, May ST, Ware DH.** 2000. Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**, 1477-1480.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jürgens G, Laux T.** 2000. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635-644.
- Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N, Scott RJ.** 2006. The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* **133**, 251-261.
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D.** 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell* **8**, 517-527.
- Schwarz S, Grande AV, Bujdoso N, Saedler H, Huijser P.** 2008. The microRNA regulated SBP-box genes *SPL9* and *SPL15* control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **67**, 183-195.
- Serivichyaswat P, Ryu HS, Kim W, Kim S, Chung KS, Kim JJ, Ahn JH.** 2015. Expression of the floral repressor miRNA156 is positively regulated by the AGAMOUS-like proteins AGL15 and AGL18. *Molecules and Cells* **38**, 259-266.

- Serralbo O, Pérez-Pérez JM, Heidstra R, Scheres B.** 2006. Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of *HOBBIT*, an *Arabidopsis* *CDC27* homolog. *PNAS* **103**, 13250-13255.
- Sessions A, Weigel D, Yanofsky MF.** 1999. The *Arabidopsis thaliana* *MERISTEM LAYER 1* promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant Journal* **20**, 259-263.
- Shigenaga AM, Argueso CT.** 2016. No hormone to rule them all: interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **56**, 174-189.
- Shikata M, Koyama T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M.** 2009. *Arabidopsis* SBP-box genes *SPL10*, *SPL11* and *SPL2* control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase. *Plant and Cell Physiology* **50**, 2133-2145.
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T.** 1998. The *Arabidopsis* *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**, 155-169.
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP.** 2001. Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1555-1566.
- Skinner DJ, Hill TA, Gasser CS.** 2004. Regulation of ovule development. *Plant Cell* **16 Suppl**, S32-S45.
- Skoog F, Miller CO.** 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* **11**, 118-130.
- Sluis A, Hake S.** 2015. Organogenesis in plants: initiation and elaboration of leaves. *Trends in Genetics* **31**, 300-306.
- Smith MR, Willmann MR, Wu G, Berardini TZ, Moller B, Weijers D, Poethig RS.** 2009. Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*. *PNAS* **106**, 5424-5429.
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM.** 1990. Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Snow M, Snow R.** 1931. Experiments on phyllotaxis. I. The effect of isolating a primordium. *Philos Trans R Soc Lond B* **221**, 1-43.
- Sonoda Y, Sako K, Maki Y, Yamazaki N, Yamamoto H, Ikeda A, Yamaguchi J.** 2009. Regulation of leaf organ size by the *Arabidopsis* RPT2a 19S proteasome subunit. *Plant Journal* **60**, 68-78.
- Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ.** 2004. *AtXRN4* degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Molecular Cell* **15**, 173-183.
- Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C.** 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols* **1**, 2019-2025.
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schmülling T.** 2004. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1299-1305.
- Spinelli SV, Martin AP, Viola IL, Gonzalez DH, Palatnik JF.** 2011. A mechanistic link between STM and CUC1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiology* **156**, 1894-1904.
- Squatrito M, Mancino M, Donzelli M, Areces LB, Draetta GF.** 2004. EBP1 is a nucleolar growth-regulating protein that is part of pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes. *Oncogene* **23**, 4454-4465.
- Srikanth A, Schmid M.** 2011. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 2013-2037.

- Stief A, Altmann S, Hoffmann K, Pant BD, Scheible WR, Bäurle I.** 2014. *Arabidopsis* miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *Plant Cell* **26**, 1792-1807.
- Stolz A, Riefler M, Lomin SN, Achazi K, Romanov GA, Schmülling T.** 2011. The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant Journal* **67**, 157-168.
- Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G.** 2001. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**, 1116-1120.
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K.** 2003. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 544-553.
- Sullivan M, Morgan DO.** 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature Rev Mol Cell Biol* **8**, 894-903.
- Sun JQ, Niu QW, Tarkowski P, Zheng BL, Tarkowska D, Sandberg G, Chua NH, Zuo JR.** 2003. The *Arabidopsis* *AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis. *Plant Physiology* **131**, 167-176.
- Sundaresan V.** 2005. Control of seed size in plants. *PNAS* **102**, 17887-17888.
- Suzuki T, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T.** 1998. Histidine-containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **39**, 1258-1268.
- Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, Yamada H, Aiba H, Mizuno T.** 2001. The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology* **42**, 107-113.
- Swanson R, Clark T, Preuss D.** 2005. Expression profiling of *Arabidopsis* stigma tissue identifies stigma-specific genes. *Sexual Plant Reproduction* **18**, 163-171.
- Symons GM, Reid JB.** 2004. Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiology* **135**, 2196-2206.
- Szekeres M, Németh K, Koncz-Kalman Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C.** 1996. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**, 171-182.
- Tajima Y, Imamura A, Kiba T, Amano Y, Yamashino T, Mizuno T.** 2004. Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 28-39.
- Takada S, Jürgens G.** 2007. Transcriptional regulation of epidermal cell fate in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **134**, 1141-1150.
- Takada S, Takada N, Yoshida A.** 2013. *ATML1* promotes epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* shoots. *Development* **140**, 1919-1923.
- Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, Utsumi M, Watanabe Y.** 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant and Cell Physiology* **49**, 493-500.
- Takeda S, Hanano K, Kariya A, Shimizu S, Zhao L, Matsui M, Tasaka M, Aida M.** 2011. CUP-SHAPED COTYLEDON1 transcription factor activates the expression of *LSH4* and *LSH3*, two members of the *ALOG* gene family, in shoot organ boundary cells. *Plant Journal* **66**, 1066-1077.
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T.** 2001a. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 26405-26410.

- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T.** 2001b. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* **42**, 85-93.
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H.** 2003. A method for separation and determination of cytokinin nucleotides from plant tissues. *J Plant Res* **116**, 265-269.
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H.** 2004a. *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *J Biol Chem* **279**, 41866-41872.
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara H.** 2004b. *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1053-1062.
- Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S, Shimamoto K.** 2007. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**, 1033-1036.
- Tanaka N.** 2012. Gibberellin is not a regulator of miR156 in rice juvenile-adult phase change. *Rice* **5**, 25.
- Tanaka Y, Suzuki T, Yamashino T, Mizuno T.** 2004. Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 462-465.
- Taniguchi M, Sasaki N, Tsuge T, Aoyama T, Oka A.** 2007. ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant and Cell Physiology* **48**, 263-277.
- Telfer A, Bollman KM, Poethig RS.** 1997. Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 645-654.
- Ten Hove CA, Lu KJ, Weijers D.** 2015. Building a plant: cell fate specification in the early *Arabidopsis* embryo. *Development* **142**, 420-430.
- Teotia S, Tang G.** 2015. To bloom or not to bloom: role of microRNAs in plant flowering. *Molecular Plant* **8**, 359-377.
- To JPC, Haberer G, Ferreira FJ, Deruere J, Mason MG, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ.** 2004. Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**, 658-671.
- To JPC, Deruère J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ.** 2007. Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**, 3901-3914.
- Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, Weigel D.** 2010. A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics* **6**, e1001031.
- Tokunaga H, Kojima M, Kuroha T, Ishida T, Sugimoto K, Kiba T, Sakakibara H.** 2012. *Arabidopsis* LONELY GUY (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant Journal* **69**, 355-365.
- Trost G, Vi SL, Czesnick H, Lange P, Holton N, Giavalisco P, Zipfel C, Kappel C, Lenhard M.** 2014. *Arabidopsis* poly(A) polymerase PAPS1 limits founder-cell recruitment to organ primordia and suppresses the salicylic acid-independent immune response downstream of EDS1/PAD4. *Plant Journal* **77**, 688-699.
- Tsukaya H, Byrne ME, Horiguchi G, Sugiyama M, Van Lijsebettens M, Lenhard M.** 2013. How do 'housekeeping' genes control organogenesis? - unexpected new findings on the role of housekeeping genes in cell and organ differentiation. *J Plant Res* **126**, 3-15.
- Ueguchi C, Sato S, Kato T, Tabata S.** 2001. The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **42**, 751-755.

- Urbanová T, Tarkowská D, Novák O, Hedden P, Strnad M.** 2013. Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **112**, 85-94.
- Usami T, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H.** 2009. The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* genes in the control of heteroblasty. *Development* **136**, 955-964.
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G.** 2004. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**, 1003-1006.
- Van Overbeek J, Conklin ME, Blakeslee AF.** 1941. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young datura embryos. *Science* **94**, 350-351.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, research0034.0031-0034.0011.
- Vanstraelen M, Benková E.** 2012. Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 463-487.
- Vaucheret H, Béclin C, Elmayer T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S.** 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant Journal* **16**, 651-659.
- Vaucheret H.** 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* **13**, 350-358.
- Vazquez F, Gascioli V, Crété P, Vaucheret H.** 2004. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current Biology* **14**, 346-351.
- Vercruyssen L, Verkest A, Gonzalez N, Heyndrickx KS, Eeckhout D, Han SK, Jegu T, Archacki R, Van Leene J, Andriankaja M, De Bodt S, Abeel T, Coppens F, Dhondt S, De Milde L, Vermeersch M, Maleux K, Gevaert K, Jerzmanowski A, Benhamed M, Wagner D, Vandepoele K, De Jaeger G, Inzé D.** 2014. ANGUSTIFOLIA3 binds to SWI/SNF chromatin remodeling complexes to regulate transcription during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* **26**, 210-229.
- Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL.** 2008. Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *PNAS* **105**, 9829-9834.
- Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J.** 1975. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *J Gen Virol* **26**, 33-48.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D.** 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* **33**, 949-956.
- Vroemen CW, Mordhorst AP, Albrecht C, Kwaaitaal MACJ, De Vries SC.** 2003. The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 1563-1577.
- Wabnik K, Robert HS, Smith RS, Friml J.** 2013. Modeling framework for the establishment of the apical-basal embryonic axis in plants. *Current Biology* **23**, 2513-2518.
- Wada KC, Yamada M, Shiraya T, Takeno K.** 2010. Salicylic acid and the flowering gene *FLOWERING LOCUS T* homolog are involved in poor-nutrition stress-induced flowering of *Pharbitis nil*. *J Plant Physiol* **167**, 447-452.
- Wahl V, Ponnu J, Schlereth A, Arrivault S, Langenecker T, Franke A, Feil R, Lunn JE, Stitt M, Schmid M.** 2013. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **339**, 704-707.
- Wang FF, Perry SE.** 2013. Identification of direct targets of FUSCA3, a key regulator of *Arabidopsis* seed development. *Plant Physiology* **161**, 1251-1264.

- Wang J, Ma XM, Kojima M, Sakakibara H, Hou BK.** 2011. N-Glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **52**, 2200-2213.
- Wang J, Ma XM, Kojima M, Sakakibara H, Hou BK.** 2013a. Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin N-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **65**, 9-16.
- Wang JW, Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D.** 2008. Dual effects of miR156-targeted *SPL* genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**, 1231-1243.
- Wang JW, Czech B, Weigel D.** 2009. miR156-regulated *SPL* transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **138**, 738-749.
- Wang L, Song X, Gu L, Li X, Cao S, Chu C, Cui X, Chen X, Cao X.** 2013b. NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple MicroRNA biogenesis factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 715-727.
- Wang S, Zhu QH, Guo X, Gui Y, Bao J, Helliwell C, Fan L.** 2007. Molecular evolution and selection of a gene encoding two tandem microRNAs in rice. *FEBS Letters* **581**, 4789-4793.
- Wei S, Gruber MY, Yu B, Gao MJ, Khachatourians GG, Hegedus DD, Parkin IA, Hannoufa A.** 2012. *Arabidopsis* mutant *sk156* reveals complex regulation of *SPL15* in a miR156-controlled gene network. *Bmc Plant Biology* **12**, 169.
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T.** 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *PNAS* **98**, 10487-10492.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T.** 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmülling T.** 2006. New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* **8**, 371-381.
- Werner T, Schmülling T.** 2009. Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 527-538.
- White DW.** 2006. *PEAPOD* regulates lamina size and curvature in *Arabidopsis*. *PNAS* **103**, 13238-13243.
- Wu G, Poethig RS.** 2006. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target *SPL3*. *Development* **133**, 3539-3547.
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS.** 2009. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* **138**, 750-759.
- Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmülling T.** 2011. The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology* **156**, 1808-1818.
- Wurgler-Murphy SM, Saito H.** 1997. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 172-176.
- Xia T, Li N, Dumenil J, Li J, Kamenski A, Bevan MW, Gao F, Li Y.** 2013. The ubiquitin receptor DA1 interacts with the E3 ubiquitin ligase DA2 to regulate seed and organ size in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 3347-3359.
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC.** 2005. Expression of *Arabidopsis* *MIRNA* genes. *Plant Physiology* **138**, 2145-2154.
- Xing S, Salinas M, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P.** 2010. MiR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 3935-3950.

- Xu M, Hu T, Zhao J, Park MY, Earley KW, Wu G, Yang L, Poethig RS.** 2016. Developmental functions of miR156-regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics* **12**, e1006263.
- Yadav RK, Girke T, Pasala S, Xie M, Reddy GV.** 2009. Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *PNAS* **106**, 4941-4946.
- Yadav RK, Tavakkoli M, Xie M, Girke T, Reddy GV.** 2014. A high-resolution gene expression map of the *Arabidopsis* shoot meristem stem cell niche. *Development* **141**, 2735-2744.
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T.** 2001. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017-1023.
- Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D.** 2009. The microRNA-regulated SBP-box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Developmental Cell* **17**, 268-278.
- Yamaguchi S.** 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 225-251.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S.** 2004. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors. *J Mol Biol* **337**, 49-63.
- Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N.** 2005. *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology* **15**, 1566-1571.
- Yang L, Liu ZQ, Lu F, Dong AW, Huang H.** 2006a. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **47**, 841-850.
- Yang L, Conway SR, Poethig RS.** 2011. Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156. *Development* **138**, 245-249.
- Yang L, Wu G, Poethig RS.** 2012. Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in *Arabidopsis*. *PNAS* **109**, 315-320.
- Yang L, Xu M, Koo Y, He J, Poethig RS.** 2013. Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of *MIR156A* and *MIR156C*. *Elife* **2**, e00260.
- Yang SW, Chen HY, Yang J, Machida S, Chua NH, Yuan YA.** 2010. Structure of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing. *Structure* **18**, 594-605.
- Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X.** 2006b. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research* **34**, 667-675.
- Yanovsky MJ, Kay SA.** 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 308-312.
- Yant L, Mathieu J, Dinh TT, Ott F, Lanz C, Wollmann H, Chen X, Schmid M.** 2010. Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell* **22**, 2156-2170.
- Yao XZ, Wang H, Li H, Yuan ZH, Li FP, Yang L, Huang H.** 2009. Two types of *cis*-acting elements control the abaxial epidermis-specific transcription of the *MIR165a* and *MIR166a* genes. *FEBS Letters* **583**, 3711-3717.
- Yeats TH, Rose JK.** 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology* **163**, 5-20.
- Yokoyama A, Yamashino T, Amano Y, Tajima Y, Imamura A, Sakakibara H, Mizuno T.** 2007. Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **48**, 84-96.

- Yu B, Yang ZY, Li JJ, Minakhina S, Yang MC, Padgett RW, Steward R, Chen XM. 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* **307**, 932-935.
- Yu B, Bi L, Zheng B, Ji L, Chevalier D, Agarwal M, Ramachandran V, Li W, Lagrange T, Walker JC, Chen X. 2008. The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *PNAS* **105**, 10073-10078.
- Yu N, Cai WJ, Wang S, Shan CM, Wang LJ, Chen XY. 2010. Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted *SPL* genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 2322-2335.
- Yu N, Niu QW, Ng KH, Chua NH. 2015. The role of miR156/SPLs modules in *Arabidopsis* lateral root development. *Plant Journal* **83**, 673-685.
- Yu S, Galvão VC, Zhang YC, Horrer D, Zhang TQ, Hao YH, Feng YQ, Wang S, Schmid M, Wang JW. 2012. Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *Plant Cell* **24**, 3320-3332.
- Yu S, Cao L, Zhou CM, Zhang TQ, Lian H, Sun Y, Wu JQ, Huang JR, Wang GD, Wang JW. 2013. Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *Elife* **2**, e00269.
- Yumul RE, Kim YJ, Liu X, Wang R, Ding J, Xiao L, Chen X. 2013. *POWERDRESS* and diversified expression of the *MIR172* gene family bolster the floral stem cell network. *Plos Genetics* **9**, e1003218.
- Zeng Y, Cullen BR. 2004. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Research* **32**, 4776-4785.
- Zhang K, Novak O, Wei Z, Gou M, Zhang X, Yu Y, Yang H, Cai Y, Strnad M, Liu CJ. 2014a. *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature Communications* **5**, 3274.
- Zhang S, Xie M, Ren G, Yu B. 2013a. CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. *PNAS* **110**, 17588-17593.
- Zhang S, Liu Y, Yu B. 2014b. PRL1, an RNA-binding protein, positively regulates the accumulation of miRNAs and siRNAs in *Arabidopsis*. *Plos Genetics* **10**, e1004841.
- Zhang SX, Liu YH, Yu B. 2015a. New insights into pri-miRNA processing and accumulation in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **6**, 533-545.
- Zhang T, Wang J, Zhou C. 2015b. The role of miR156 in developmental transitions in *Nicotiana tabacum*. *Science China Life Sciences* **58**, 253-260.
- Zhang TQ, Lian H, Tang H, Dolezal K, Zhou CM, Yu S, Chen JH, Chen Q, Liu H, Ljung K, Wang JW. 2015c. An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants. *Plant Cell* **27**, 349-360.
- Zhang WJ, To JPC, Cheng CY, Schaller GE, Kieber JJ. 2011. Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *Plant Journal* **68**, 1-10.
- Zhang WJ, Swarup R, Bennett M, Schaller GE, Kieber JJ. 2013b. Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the *Arabidopsis* root apical meristem. *Current Biology* **23**, 1979-1989.
- Zhao J, Chen HY, Ren D, Tang HW, Qiu R, Feng JL, Long YM, Niu BX, Chen DP, Zhong TY, Liu YG, Guo JX. 2015. Genetic interactions between diverged alleles of *Early heading date 1 (Ehd1)* and *Heading date 3a (Hd3a)/RICE FLOWERING LOCUS T1 (RFT1)* control differential heading and contribute to regional adaptation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* **208**, 936-948.
- Zhao X, Zhang H, Li L. 2013. Identification and analysis of the proximal promoters of microRNA genes in *Arabidopsis*. *Genomics* **101**, 187-194.

- Zhao Z, Andersen SU, Ljung K, Dolezal K, Miotk A, Schultheiss SJ, Lohmann JU.** 2010. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* **465**, 1089-1092.
- Zhu Q-H, Upadhyaya NM, Gubler F, Helliwell CA.** 2009. Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). *Bmc Plant Biology* **9**, 149.
- Zhu QH, Helliwell CA.** 2011. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *J Exp Bot* **62**, 487-495.
- Zubko E, Adams CJ, Macháèková I, Malbeck J, Scollan C, Meyer P.** 2002. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant Journal* **29**, 797-808.
- Zürcher E, Tavor-Deslex D, Lituiev D, Enkerli K, Tarr PT, Müller B.** 2013. A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network *in planta*. *Plant Physiology* **161**, 1066-1075.
- Zwack PJ, Rashotte AM.** 2015. Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *J Exp Bot* **66**, 4863-4871.

Anhang

Unterstützende Daten

Tab. S1: Generierte transgene Pflanzenlinien.

Transgen in Col-0	Generation	Phänotyp	Referenz
pANT::ARR1:SRDX:4xMyc	T4	kein offensichtlicher Phänotyp; interessant ist hierbei der Unterschied zum Konstrukt pANT::CKX3 (Holst <i>et al.</i> , 2011)	Sören Werner
pANT::IPT7	T2	kein offensichtlicher Phänotyp	Sören Werner
pANT::LOG4	T3	größere Rosettenblätter, erhöhter Chlorophyllgehalt	Sören Werner
pANT::ROCK2:4xMyc	T3	sehen meist aus wie Col-0/pATML1::ROCK2:4xMyc (reduzierte Blattzahl und -breite; alle Pflanzenorgane bilden haarähnliche Strukturen aus, sogar die Schoten; es werden kaum Samen gebildet), es konnten aber auch stärkere Phänotypen beobachtet werden: von kleinwüchsigen Pflanzen mit Rosettenblättern, welche kaum noch als solche zu erkennen sind, bis hin zu „kleinen Büschen“ (kugelförmiger Habitus, der nur noch Blätterstrukturen erkennen lässt)	Sören Werner
pATML1::ARR1:SRDX:4xMyc	T4	s. Ergebnisteil	Sören Werner
pATML1::CKX1:4xMyc	T4	s. Ergebnisteil	Sören Werner
pATML1::IPT7	T4	kein offensichtlicher Phänotyp	Sören Werner
pATML1::LOG4	T4	s. Ergebnisteil	Sören Werner
pATML1::ROCK2:4xMyc	T3	reduzierte Blattzahl und -breite; alle Pflanzenorgane bilden haarähnliche Strukturen aus, sogar die Schoten; es werden kaum Samen gebildet	Sören Werner
pCUC3::ARR1:SRDX:tCUC3	T4	Pflanzen z. T. insgesamt kleiner mit weniger und schmaleren Blättern sowie dünneren Stengeln (keine hundertprozentige Penetranz)	Sören Werner
pCUC3::CKX1:tCUC3	T4	kein offensichtlicher Phänotyp	Sören Werner
pCUC3::IPT7:tCUC3	T4	kein offensichtlicher Phänotyp	Sören Werner
pCUC3::LOG4:tCUC3	T2	größere Rosettenblätter, erhöhter Chlorophyllgehalt, an der Basis größerer Stengeldurchmesser	Sören Werner
pCUC3::ROCK2:tCUC3	T4	starker Phänotyp: deformierte Blätter, kurzer Spross, der in Blattstrukturen terminiert, wenige bis keine Blüten/Schoten (ähnelt <i>stm-2</i> , abgesehen vom Blattphänotyp); schwächer ausgeprägter Phänotyp: deformierte Blätter, zusätzliche Rosetten entlang des Stengels; Schoten werden gebildet, die Organpositionierung ist aber irregulär (ähnelt <i>wus-1</i> , abgesehen vom Blattphänotyp und der veränderten Phyllotaxis); im Keimlingsstadium sind Probleme bei der Etablierung bzw. Aufrechterhaltung des SAMs zu beobachten	Sören Werner
pHB8::ARR1:SRDX	T4	deutlich späterer Blühzeitpunkt; reduzierte Apikaldominanz	Elisabeth Otto
pHB8::CKX1	T4	deutlich späterer Blühzeitpunkt; reduzierte Apikaldominanz	Elisabeth Otto
pHB8::ROCK2	T4	Pflanzen scheinen insgesamt einen geringeren Turgordruck aufzuweisen, sie wirken bereits im Keimlingsstadium schlapp und kraftlos	Elisabeth Otto
pHMG::ARR1:SRDX	T4	kein offensichtlicher Phänotyp	Sören Werner
pHMG::CKX1	T4	kein offensichtlicher Phänotyp	Sören Werner
pHMG::IPT7	T2	kein offensichtlicher Phänotyp	Sören Werner
pHMG::LOG4	T2	größere Rosettenblätter (T1), erhöhter Chlorophyllgehalt	Sören Werner
pHMG::ROCK2	T4	Pflanzen wachsen noch weiter, wenn der Wildtyp das Wachstum bereits eingestellt hat; homozygote Pflanzen sterben oft frühzeitig oder produzieren kaum Samen; frühzeitiger Abbruch der Entwicklung der Samenanlagen und der gesamten Schote	Sören Werner

Tab. S2: Cytokiningehalt im Spross von pATML1:LOG4- und pATML1:CKX1-4xMyc-Pflanzen.

Nr.	Genotyp	tZ		tZOG		tZR		tZROG		tZRMP		tZ7G		tZ9G	
1	Col-0	1,69	1,35	9,88	9,76	2,63	2,01	0,58	0,49	21,00	17,73	54,70	46,11	20,13	14,99
2		1,16	0,23	8,23	1,15	1,84	0,45	0,38	0,08	15,97	2,24	41,03	5,94	12,11	3,70
3		1,26		9,93		1,58		0,50		17,29		44,20		12,50	
4		1,30		11,01		1,99		0,51		16,66		44,51		15,22	
5	AC #32	0,55	0,42	3,30	2,63	0,37	0,33	0,15	0,11	5,17	3,98	13,78	11,93	4,05	3,28
6		0,40	0,09	2,41	0,48	0,42	0,07	0,08	0,04	3,89	0,94	11,18	1,54	2,88	0,59
7		0,38		2,62		0,28		0,12		3,99		12,50		3,41	
8		0,34		2,18		0,26		0,08		2,86		10,26		2,77	
9	AC #37	0,41	0,39	4,20	3,48	0,51	0,48	0,17	0,16	4,81	4,07	14,42	13,13	3,35	2,80
10		0,39	0,02	3,03	0,51	0,61	0,11	0,13	0,02	4,10	0,66	12,56	0,98	2,89	0,62
11		0,36		3,46		0,34		0,17		3,21		12,22		1,91	
12		0,40		3,23		0,47		0,17		4,14		13,33		3,03	
13	AL #17	1,60	1,58	12,46	12,34	2,01	1,97	0,50	0,46	14,28	14,61	53,43	53,49	11,75	14,09
14		1,36	0,18	11,14	0,85	1,87	0,28	0,38	0,08	11,93	2,55	48,74	4,62	15,22	1,65
15		1,55		12,68		1,68		0,42		14,15		52,02		15,28	
16		1,79		13,11		2,34		0,55		18,07		59,76		14,09	
17	AL #22	2,11	2,10	14,70	15,10	2,10	1,95	0,45	0,46	14,86	15,32	59,68	59,51	18,07	16,83
18		2,14	0,05	15,38	1,43	2,15	0,21	0,49	0,03	16,49	1,47	57,80	2,29	15,38	1,19
19		2,12		16,88		1,72		0,47		16,50		62,69		16,39	
20		2,03		13,45		1,82		0,43		13,44		57,86		17,47	
Nr.	Genotyp	cZ		cZOG		cZR		cZROG		cZRMP		cZ9G			
1	Col-0	0,06	0,06	0,73	0,60	0,39	0,33	0,81	0,70	5,03	5,57	0,10	0,09		
2		0,06	0,01	0,40	0,21	0,26	0,06	0,62	0,11	5,24	0,96	0,07	0,01		
3		0,07		0,45		0,38		0,78		7,00		0,09			
4		0,06		0,84		0,31		0,59		5,00		0,09			
5	AC #32	0,07	0,05	0,63	0,55	0,17	0,18	0,55	0,52	1,90	1,59	0,02	0,02		
6		0,04	0,01	0,46	0,10	0,19	0,01	0,51	0,03	1,42	0,24	0,02	0,00		
7		0,04		0,65		0,20		0,48		1,37		0,02			
8		0,05		0,46		0,17		0,52		1,66		0,02			
9	AC #37	0,03	0,03	0,95	0,70	0,15	0,17	0,57	0,54	1,49	1,85	0,02	0,02		
10		0,02	0,01	0,50	0,19	0,16	0,02	0,53	0,02	1,91	0,33	0,02	0,00		
11		0,04		0,68		0,19		0,52		1,72		0,01			
12		0,04		0,66		0,19		0,55		2,28		0,01			
13	AL #17	0,10	0,09	0,55	0,55	0,41	0,31	0,79	0,69	5,09	4,81	0,12	0,11		
14		0,08	0,01	0,52	0,06	0,29	0,07	0,63	0,07	4,67	0,32	0,13	0,02		
15		0,09		0,51		0,28		0,67		5,06		0,09			
16		0,08		0,63		0,25		0,66		4,43		0,09			
17	AL #22	0,10	0,12	0,58	0,53	0,24	0,26	0,77	0,66	4,72	5,06	0,13	0,13		
18		0,12	0,01	0,53	0,03	0,30	0,03	0,68	0,08	5,01	0,35	0,13	0,01		
19		0,14		0,51		0,25		0,60		5,56		0,13			
20		0,12		0,51		0,25		0,61		4,96		0,14			

Fortsetzung nächste Seite.

Tab. S2: Cytokiningehalt im Spross von pATML1:LOG4- und pATML1:CKX1-4xMyc-Pflanzen (Fortsetzung).

Nr.	Genotyp	DHZ		DHZOG		DHZR		DHZROG		DHZRMP		DHZ7G		DHZ9G	
1	Col-0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,13	0,06	0,03	0,05	0,08	0,07	2,11	1,97	0,13	0,12
2		0,02	<i>0,00</i>	0,02	<i>0,00</i>	0,05	<i>0,04</i>	0,05	<i>0,01</i>	0,07	<i>0,01</i>	2,10	<i>0,22</i>	0,12	<i>0,01</i>
3		0,02		n. d.		0,05		0,06		0,05		1,65		0,11	
4		0,01		0,02		0,04		0,05		0,06		2,02		0,12	
5	AC #32	0,03	0,03	0,17	0,16	0,09	0,09	0,06	0,09	0,13	0,10	3,91	3,22	0,21	0,19
6		0,03	<i>0,01</i>	0,14	<i>0,04</i>	0,06	<i>0,04</i>	0,05	<i>0,06</i>	0,10	<i>0,03</i>	2,82	<i>0,52</i>	0,19	<i>0,02</i>
7		0,02		0,12		0,06		n. d.		0,08		3,34		0,19	
8		0,04		0,21		0,14		0,16		0,08		2,81		0,16	
9	AC #37	0,03	0,02	0,15	0,13	0,06	0,06	n. d.	0,04	0,12	0,11	4,09	3,91	0,18	0,19
10		0,02	<i>0,00</i>	0,09	<i>0,03</i>	0,07	<i>0,01</i>	0,02	<i>0,03</i>	0,11	<i>0,01</i>	3,82	<i>0,15</i>	0,20	<i>0,02</i>
11		0,02		0,13		0,05		0,03		0,10		3,76		0,20	
12		0,03		0,14		0,05		0,07		0,12		3,96		0,16	
13	AL #17	0,02	0,02	0,08	0,06	0,06	0,04	0,10	0,06	0,04	0,05	2,74	2,50	0,16	0,15
14		0,02	<i>0,00</i>	n. d.	<i>0,02</i>	0,04	<i>0,01</i>	0,07	<i>0,03</i>	0,04	<i>0,01</i>	2,22	<i>0,21</i>	0,17	<i>0,02</i>
15		0,02		0,05		0,03		0,02		0,06		2,54		0,12	
16		0,02		0,05		0,04		0,05		0,07		2,48		0,13	
17	AL #22	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,07	0,05	0,07	0,06	3,62	3,48	0,25	0,22
18		0,03	<i>0,00</i>	0,04	<i>0,01</i>	0,05	<i>0,01</i>	0,05	<i>0,01</i>	0,08	<i>0,01</i>	3,66	<i>0,52</i>	0,22	<i>0,03</i>
19		0,02		0,05		0,04		0,04		0,07		3,92		0,23	
20		0,02		0,02		0,03		0,05		0,05		2,73		0,17	
Nr.	Genotyp	iP		iPR		iPRMP		iP7G		iP9G					
1	Col-0	0,34	0,34	2,23	1,82	19,04	16,08	18,75	16,53	2,55	2,20				
2		0,39	<i>0,07</i>	1,26	<i>0,41</i>	14,09	<i>2,13</i>	14,75	<i>1,67</i>	1,83	<i>0,30</i>				
3		0,39		1,83		16,06		16,58		2,29					
4		0,25		1,96		15,12		16,04		2,14					
5	AC #32	0,26	0,23	1,35	1,21	8,49	7,33	6,00	5,29	0,61	0,54				
6		0,26	<i>0,05</i>	1,20	<i>0,09</i>	7,02	<i>1,01</i>	5,41	<i>0,58</i>	0,53	<i>0,05</i>				
7		0,16		1,14		7,70		5,17		0,55					
8		0,25		1,15		6,11		4,60		0,49					
9	AC #37	0,24	0,21	0,89	0,84	9,31	8,26	6,20	5,72	0,60	0,57				
10		0,20	<i>0,07</i>	0,85	<i>0,12</i>	7,69	<i>0,79</i>	5,23	<i>0,50</i>	0,59	<i>0,03</i>				
11		0,13		0,68		7,62		5,35		0,54					
12		0,29		0,96		8,39		6,11		0,54					
13	AL #17	0,53	0,39	3,09	2,21	12,97	13,52	16,35	17,14	2,71	2,54				
14		0,26	<i>0,11</i>	1,57	<i>0,69</i>	12,22	<i>2,12</i>	14,91	<i>1,93</i>	2,40	<i>0,13</i>				
15		0,35		1,77		12,22		17,91		2,55					
16		0,43		2,43		16,65		19,38		2,51					
17	AL #22	0,42	0,38	1,49	1,62	12,33	12,74	23,16	24,04	2,91	3,07				
18		0,33	<i>0,04</i>	1,71	<i>0,23</i>	14,55	<i>1,57</i>	24,26	<i>2,15</i>	3,22	<i>0,15</i>				
19		0,41		1,39		13,25		26,90		3,17					
20		0,37		1,90		10,81		21,85		2,98					

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Etwa 20 mg Sprossmaterial von sieben Tage alten Keimlingen wurden geerntet und vereinigt. Die Werte sind in pmol/g FG angegeben. Die Mittelwerte sind in fett-kursiv, die Standardabweichungen in kursiv angegeben. 7G = N^7 -Glucosid, 9G = N^9 -Glucosid, AC = pATML1:CKX1-4xMyc, AL = pATML1:LOG4, cZ = *cis*-Zeatin, DHZ = Dihydrozeatin, iP = N^6 -Isopentenyladenin, OG = *O*-Glucosid, R = Ribosid, RMP = Ribosid-5'-Monophosphat, tZ = *trans*-Zeatin, ROG = Ribosid-*O*-Glucosid.

Tab. S3: Gibberellin Gehalt im Spross von Pflanzen mit verändertem Cytokininstatus.

Nr.	Genotyp	GA-Gehalt (C ₁₃ nicht hydroxyliert) [pg/mg FG]																			
		GA ₁₂ -Ald.	GA ₁₂	GA ₁₅	GA ₂₄	GA ₁₃	GA ₉	GA ₇	GA ₄	GA ₅₁	GA ₃₄										
1	Col-0	41,69	41,25	0,50	0,61	0,13	0,15	2,02	1,70	0,05	0,06	0,46	0,37	0,05	0,06	0,28	0,39	3,41	2,81	0,71	0,75
2		46,64	<i>4,34</i>	0,72	<i>0,11</i>	0,12	<i>0,04</i>	2,05	<i>0,34</i>	0,07	<i>0,01</i>	0,25	<i>0,11</i>	0,03	<i>0,01</i>	0,35	<i>0,19</i>	2,15	<i>0,67</i>	0,71	<i>0,16</i>
3		34,51		0,50		0,16		1,34		0,04		0,49		0,04		0,21		2,12		0,58	
4		42,16		0,72		0,21		1,38		0,07		0,27		0,02		0,71		3,55		1,01	
5	ahk2 ahk3	28,35	25,93	2,10	2,02	0,47	0,41	0,72	1,06	0,04	0,04	0,61	0,62	0,06	0,04	0,97	1,27	3,25	2,58	0,57	0,45
6		29,09	<i>2,84</i>	2,43	<i>0,34</i>	0,32	<i>0,06</i>	1,09	<i>0,24</i>	0,04	<i>0,00</i>	0,65	<i>0,05</i>	0,03	<i>0,02</i>	1,31	<i>0,33</i>	3,21	<i>0,66</i>	0,46	<i>0,08</i>
7		23,81		1,49		0,46		1,40		0,03		0,68		0,02		1,81		2,06		0,41	
8		22,48		2,06		0,38		1,03		0,04		0,54		0,03		1,02		1,80		0,34	
9	rock2	28,50	27,61	1,41	1,57	0,03	0,05	1,48	1,36	0,09	0,11	0,24	0,29	0,01	0,01	0,70	0,85	3,13	3,22	0,40	0,30
10		25,41	<i>3,87</i>	1,92	<i>0,33</i>	0,03	<i>0,02</i>	1,11	<i>0,15</i>	0,14	<i>0,02</i>	0,30	<i>0,04</i>	0,01	<i>0,00</i>	0,96	<i>0,12</i>	3,89	<i>0,43</i>	0,24	<i>0,06</i>
11		23,09		1,84		0,07		1,45		0,10		0,35		0,01		0,76		2,67		0,25	
12		33,43		1,10		0,08		1,41		0,11		0,29		0,01		0,98		3,18		0,30	
13	AC #32	13,51	14,48	2,50	2,35	0,42	0,45	2,26	2,25	0,07	0,07	0,17	0,15	0,04	0,04	0,79	0,67	2,72	2,50	0,62	0,52
14		15,22	<i>0,63</i>	2,67	<i>0,43</i>	0,51	<i>0,08</i>	2,51	<i>0,17</i>	0,07	<i>0,01</i>	0,15	<i>0,02</i>	0,03	<i>0,03</i>	0,78	<i>0,19</i>	2,66	<i>0,23</i>	0,46	<i>0,10</i>
15		14,38		1,61		0,34		2,05		0,05		0,12		0,02		0,33		2,48		0,38	
16		14,82		2,62		0,54		2,17		0,08		0,17		0,09		0,76		2,12		0,61	
17	AL #22	23,38	19,44	1,86	1,37	0,38	0,38	1,67	1,37	0,06	0,07	0,34	0,36	0,03	0,02	1,03	1,09	1,38	1,78	0,92	1,01
18		20,41	<i>2,67</i>	1,20	<i>0,29</i>	0,42	<i>0,03</i>	1,35	<i>0,21</i>	0,07	<i>0,01</i>	0,38	<i>0,02</i>	0,03	<i>0,00</i>	1,05	<i>0,07</i>	1,15	<i>0,53</i>	0,83	<i>0,14</i>
19		16,89		1,30		0,36		1,07		0,08		0,37		0,02		1,21		2,31		1,19	
20		17,07		1,11		0,37		1,37		0,08		0,37		0,02		1,07		2,31		1,10	

Nr.	Genotyp	GA-Gehalt (C ₁₃ hydroxyliert) [pg/mg FG]																			
		GA ₅₃	GA ₄₄	GA ₁₉	GA ₂₀	GA ₁	GA ₈	GA ₂₉	GA ₅	GA ₆	GA ₃										
1	Col-0	0,48	0,44	0,12	0,13	0,25	0,26	0,68	1,16	0,14	0,15	0,10	0,15	1,89	2,16	0,17	0,22	0,18	0,33	0,00	0,01
2		0,51	<i>0,06</i>	0,16	<i>0,02</i>	0,23	<i>0,03</i>	0,66	<i>0,53</i>	0,18	<i>0,02</i>	0,13	<i>0,04</i>	2,60	<i>0,35</i>	0,21	<i>0,04</i>	0,44	<i>0,17</i>	0,01	<i>0,00</i>
3		0,42		0,14		0,29		1,35		0,15		0,16		1,76		0,21		0,16		0,01	
4		0,34		0,11		0,29		1,95		0,12		0,21		2,39		0,28		0,54		0,01	
5	ahk2 ahk3	0,55	0,44	0,53	0,46	0,21	0,28	0,54	0,53	0,15	0,09	0,18	0,24	1,39	1,97	0,36	0,40	0,81	0,80	0,01	0,01
6		0,42	<i>0,07</i>	0,47	<i>0,07</i>	0,25	<i>0,06</i>	0,64	<i>0,10</i>	0,07	<i>0,03</i>	0,26	<i>0,04</i>	1,49	<i>0,53</i>	0,35	<i>0,06</i>	0,98	<i>0,14</i>	0,01	<i>0,00</i>
7		0,42		0,33		0,27		0,56		0,07		0,25		2,51		0,49		0,83		0,01	
8		0,36		0,50		0,37		0,37		0,08		0,28		2,48		0,41		0,59		0,00	
9	rock2	0,63	0,63	0,20	0,26	0,41	0,56	0,43	0,54	0,14	0,12	0,11	0,13	1,97	1,74	0,06	0,09	0,45	0,53	0,01	0,01
10		0,63	<i>0,05</i>	0,29	<i>0,03</i>	0,51	<i>0,11</i>	0,38	<i>0,14</i>	0,10	<i>0,03</i>	0,14	<i>0,01</i>	1,36	<i>0,32</i>	0,08	<i>0,01</i>	0,54	<i>0,04</i>	0,01	<i>0,00</i>
11		0,69		0,26		0,65		0,65		0,10		0,14		1,50		0,09		0,54		0,01	
12		0,56		0,27		0,67		0,69		0,16		0,13		2,13		0,10		0,57		0,01	
13	AC #32	0,37	0,41	0,43	0,52	0,40	0,40	0,75	0,68	0,05	0,07	0,28	0,33	2,29	2,40	0,50	0,40	0,45	0,51	0,01	0,01
14		0,41	<i>0,03</i>	0,59	<i>0,07</i>	0,54	<i>0,09</i>	0,65	<i>0,12</i>	0,07	<i>0,01</i>	0,45	<i>0,07</i>	2,90	<i>0,45</i>	0,41	<i>0,07</i>	0,51	<i>0,05</i>	0,02	<i>0,01</i>
15		0,45		0,48		0,33		0,49		0,06		0,26		1,72		0,30		0,50		0,01	
16		0,40		0,60		0,31		0,82		0,08		0,32		2,69		0,40		0,58		0,01	
17	AL #22	0,29	0,35	0,31	0,28	0,32	0,31	0,48	0,35	0,11	0,15	0,17	0,14	2,20	1,82	0,23	0,19	0,41	0,36	0,99	0,01
18		0,37	<i>0,04</i>	0,36	<i>0,06</i>	0,28	<i>0,02</i>	0,37	<i>0,09</i>	0,15	<i>0,03</i>	0,14	<i>0,03</i>	1,61	<i>0,44</i>	0,22	<i>0,04</i>	0,32	<i>0,05</i>	0,01	<i>0,00</i>
19		0,38		0,26		0,34		0,26		0,18		0,10		1,19		0,12		0,30		0,01	
20		0,37		0,20		0,30		0,29		0,17		0,18		2,26		0,18		0,40		0,01	

Die verwendeten Pflanzen wurden unter LD-Bedingungen angezogen. Ganze Rosetten 15 Tage alter Pflanzen wurden geerntet. Die Werte sind in pg/mg FG angegeben. Die Mittelwerte sind in fett-kursiv, die Standardabweichungen in kursiv angegeben.

Oligonukleotide

Tab. S4: Klonierungsprimer.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Kommentar
Klonierungsprimer			
29	ARR1-attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGATGAATCCGAGTCACGGAAGAGG	
66	SRDX-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATC	w/o Stopp
30	CKX1-attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGGATTGACCTCATCCTTACGGTTC	
59	CKX1-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAACAGTTCTAGGTTTCGGCAGTATTGATGC	w/o Stopp
76	pATML1-attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACAAGCCGTAGATGATTGGTTTTCTTCTC	
77	pATML1-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATAGCCGGTCAAGACATAACCCGGTG	
78	pATML1-attB4_for	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCACAAGCCGTAGATGATTGGTTTTCTTCTC	
79	pATML1-attB1r_rev	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCATAGCCGGTCAAGACATAACCCGGTG	
168	LOG4-attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGAGGTCACAATGAAACCATGC	
169	LOG4-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAACAGTCTTCAGAAGAGTAGTCAATCCGC	w/ Stopp
236	pPDF1(F)-attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGACCTAAATAGTAATACGGACTGAGAGAGAG	
237	pPDF1(F)-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATTTATGAGAATTCACCTGAGATTCAGAGAG	
238	pPDF1(F)-attB4_for	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCGACCTAAATAGTAATACGGACTGAGAGAGAG	
239	pPDF1(F)-attB1r_rev	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCATTTATGAGAATTCACCTGAGATTCAGAGAG	
242	pMIR165a-attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGGCGACCAAGTATTTAAACC	
243	pMIR165a-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATGATGAGTGGCGGAGACGAAG	
244	pMIR165a-attB4_for	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCGGGCGACCAAGTATTTAAACC	
245	pMIR165a-attB1r_rev	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCATGATGAGTGGCGGAGACGAAG	
494	pMIR172b-attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTAGTGGTGCACGAACCACATG	
495	pMIR172b-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATACAAACAACGACAGATGAGCTTTC	
496	pMIR172d-attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGCAGCCACGTCATGTCC	
497	pMIR172d-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGCCACTAECTTCAGAATCTGAAGTCA	
498	pMIR172e-attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGTGGTATAGAGGAACCTGTGTTGTG	
499	pMIR172e-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATGGCTGATAACATCCACCAAAG	

Tab. S5: Primer für den Nachweis reifer miRNAs.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Kommentar
Stem-loop-cDNA-Synthese			
340	TAFII15-qRT_rev	ACTCTTAGCCAAGTAGTGCTCC	
452	miR156-StLp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACGTGCT	Stem loop, miRNA-Teilsequenz
455	miR172abe-StLp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACATGCA	Stem loop, miRNA-Teilsequenz
Stem-loop-qRT-Primer			
453	StLp-qRT_for	CAGTGCAGGGTCCGAGGT	
454	miR156-qRT_rev	CCGTGGTGACAGAAGAGAGTGA	miRNA-Teilsequenz
459	miR172-qRT_rev	GTCCGTGGAGAATCTTGATGATG	miRNA-Teilsequenz

Tab. S6: Primer für quantitative Real-time-PCR.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Nr.	Bezeichnung	Sequenz
qRT-Primer <i>Housekeeping-Gene</i>			qRT-Primer <i>Genes of interest</i>		
339	TAFII15-qRT_for	GAATCACGGCCAACAATC	297	TOE2-qRT_for	ATCCTTCTCAGCCCTTCGTCA
340	TAFII15-qRT_rev	ACTCTTAGCCAAGTAGTGCTCC	298	TOE2-qRT_rev	GCCTTCCAACCTTATTCCAACCTC
341	AT5G15710-qRT_for	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT	343	MIR172B-qRT_for	GTTGTTTGTAGGCGCAGCAC
342	AT5G15710-qRT_rev	GATTCCAAGACGTAAGCAGATCAA	344	MIR172B-qRT_rev	GCAGCATCATCAAGATTCTCATATAC
478	PP2AA2-qRT_for	CCATTAGATCTTGTCTCTCTGCT	345	AP2-qRT2_for	GCACCACACCAACACAAGAG
479	PP2AA2-qRT_rev	GACAAAACCCGTACCGAG	346	AP2-qRT2_rev	CGAGGAAAGCCAGAAGCAAC
Genes of interest			359	MIR172D-qRT_for	TCTGAAGTTAGTGGCAGTCATTGTT
269	MIR156A-qRT_for	TGGGACAAGAGAAACGCAAAG	360	MIR172D-qRT_rev	AAGGCTCAAAGAAAACCCATAAG
270	MIR156A-qRT_rev	TGAGCACGCAAGAGAAGCAAGT	361	MIR172E-qRT_for	GAGATGTGGTTCCTTTGCTTTC
271	SPL2-qRT_for	CAAAACCGCAAGAGCCGAG	362	MIR172E-qRT_rev	GAGTAGCCATGTATTTGCTGATGC
272	SPL2-qRT_rev	TGACAGAAGAGAGAGACCATC	363	MIR156B-qRT_for	TAGAAGAGGAGAGATGGTGATTG
273	SPL3-qRT_for	AGAAGCGGAAAAGCACAAC	364	MIR156B-qRT_rev	GTGAGCACGCACACGCAA
274	SPL3-qRT_rev	TGGAGAAACAGACAGACACAGAG	365	MIR156C-qRT_for	TCTGCTCCTTTCCAATCTTCT
275	SPL4-qRT_for	AAGGCATCTTCTGTCTTTCTCTC	366	MIR156C-qRT_rev	TTATCACCTTTACCTTACCGACACA
276	SPL4-qRT_rev	CTGACCATTGATTCCTCTCCG	369	MIR156D-qRT_for	GGGGAAAAGAAGTTGACAGAAGAG
277	SPL5-qRT_for	CTCATCATCAAGCGACCACAG	370	MIR156D-qRT_rev	AGAGAGTGAGCAGCAAAAGC
278	SPL5-qRT_rev	TTACAGGACAGCATAGAGGGGAC	424	TOE3-qRT_for	ATGAGGAGAGATTATTAGGGAGCG
281	SPL9-qRT_for	GCACGGCAATGGGTGAGTT	425	TOE3-qRT_rev	AGAGAAGTGAAGGTGCGAGG
282	SPL9-qRT_rev	CAGTTGGTATGGTGAGAAGAAGATC	472	ARR1-SRDX-qRT_for	TGGCTACGGATACAGCAACAA
283	SPL10-qRT_for	ACCCTCTCTTTCTCTGCGTTTC	473	ARR1-SRDX-qRT_rev	AGCGAAACCCAAAACGGAGT
284	SPL10-qRT_rev	GAGCATTCTCCACACCTTTG	474	CKX1-qRT_for	GGAAACAAGCCTACGACCCT
285	SPL11-qRT_for	AGTGGGATTGGGAGCATTG	475	CKX1-qRT_rev	GTTCCTTTGACTTTGCGAG
286	SPL11-qRT_rev	CGATACAGCAGTGCCAGAAG	476	LOG4-qRT_for	ATCAGTACAACGCACGCCA
287	SPL15-qRT_for	TGGAGAAAAGAAGTTGTCGCAG	477	LOG4-qRT_rev	GTCAATCCGCTCTATCTCCCA
288	SPL15-qRT_rev	GTGAAAAGAGCCGTTGTGGG	487	MIM156-qRT_for	AAATGCTCACTTCTATCTTCTGTCAA
291	SMZ-qRT_for	GTGGTGGCTGATGCTCGTC	488	MIM172-qRT_for	AGCATCGAGTTCAAATTTCTAGC
292	SMZ-qRT_rev	CCTTGGTCTCTTCTGCTCTTC	489	MIM-qRT_rev	TCCTCACACAAAGAACACACAAC
293	SNZ-qRT_for	TCACATCCATCTCTCCAAAACAG	490	ARR4-qRT_for	CCGTTGACTATCTCGCCT
294	SNZ-qRT_rev	ATCCCTTCCATCTTCTTATCTC	491	ARR4-qRT_rev	CGACGTCAACACGTCAATC
295	TOE1-qRT_for	CAGACATCAGACAACCTCCGCC	492	ARR6-qRT_for	GAGCTCTCCGATGCAAAAT
296	TOE1-qRT_rev	TCTCCGCCCTACTACTTCC	493	ARR6-qRT_rev	GAAAAGGCCATAGGGGT

Tab. S7: Primer für den Nachweis des SMZ-Genverlustes in smz-4.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
Nachweis des SMZ-Genverlustes in smz-4		
292	SMZ-qRT_rev	CCTTGGTCTCTTCTGCTCTTC
507	SMZ-qRT2_for	GCAAGTTTATTGGGCGGG
509	SMZ-qRT3_for	AGGCTTGGCTCTTCAAAAATG
510	SMZ-qRT3_rev	ATGGCTCCTTCTCCCTTTCC
529	SMZ_for	ATGTTGGATCTTAACCTAAAGA
530	SMZ_rev	CTATGGATCAAACAATTGG

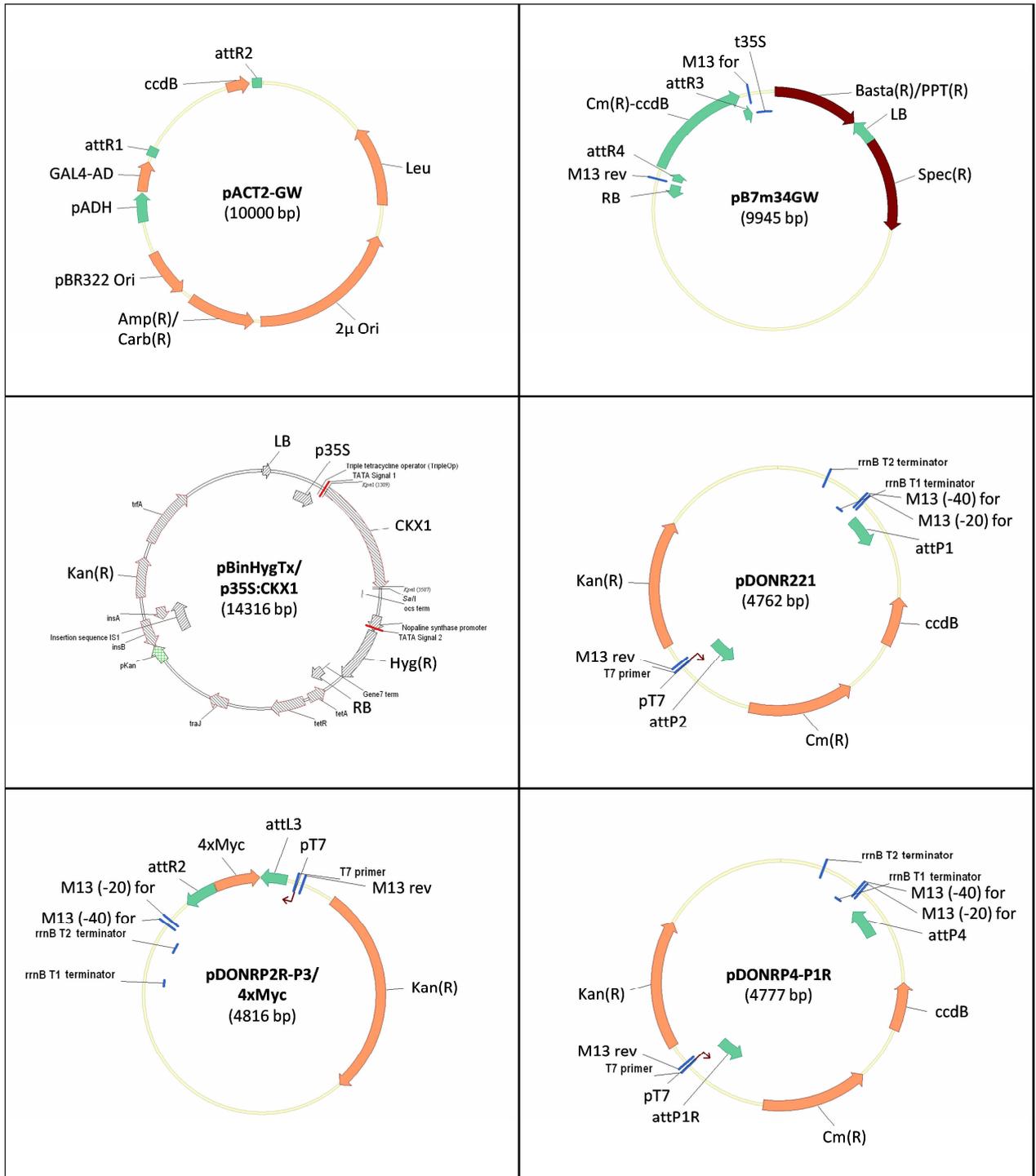
Tab. S8: Genotypisierungsprimer.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Kommentar/Referenz
Genotypisierung			
<i>ahk2-2tk</i>			
216	AHK2-5'UTR_for	GCTGAATCTGAGATTAGGAGTCG	
228	AHK2-ahk2-2tk_for	GTCTATAACTTGTGAGCTCTGAATC	Higuchi <i>et al.</i> , 2004
229	AHK2-ahk2-2tk_rev	GCTCGTGTCCATAGACAGCAAAGGTC	Higuchi <i>et al.</i> , 2004
230	T-DNA-ahk2-2tk_rev	ATAACGCTGCGGACATCTAC	Higuchi <i>et al.</i> , 2004
<i>ahk3-3, cre1-12</i>			
315	LBa1-SALK	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
37	AHK3_rev	GCAGGCCTATGGTCCACAACCACAG	Higuchi <i>et al.</i> , 2004
397	AHK3-ahk3-3_for	GCAAGAATCCAGGTGCTAAC	
398	AHK3-ahk3-3_rev	CCTATGGTCCACAACCACAG	
213	CRE1_for	GGAGAGCCTTCACCGTTAGG	
214	CRE1_rev	AAGCTCTTGCAATTCATGGAATC	Higuchi <i>et al.</i> , 2004
<i>spl9-4, toe3-2</i>			
401	LB1-SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	
408	TOE3-toe3-2_for	ATCCTGCACCTCTCTAATGATG	
409	TOE3-toe3-2_rev	GACACTATTGAAACCGGACCA	
420	SPL9-spl9-4_for	TGGTTCCTCCACTGAGTCATC	Wang <i>et al.</i> , 2008
421	SPL9-spl9-4_rev	GCTCATTATGACCAGCGAGTC	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>smz-4, spl15-1</i>			
400	LBb1.3-SALK	ATTTTGCCGATTCGGGAAC	
291	SMZ-qRT_for	GTGGTGGCTGATGCTCGTC	
411	SMZ-smz-2_rev	AATCATCCACGACGAAATTGATGTCTG	
422	SPL15-spl15-1_for	TCCACCGAGTCTTCTTCACTC	Wang <i>et al.</i> , 2008
423	SPL15-spl15-1_rev	TGTTGGTGTCTGAAGTTGCTG	Wang <i>et al.</i> , 2008
Typ-B-ARR-Mutanten			
309	ARR1-arr1-3_for	CTTCAAGCACTAGCCGTCACAGGTCAGTT	Zhang <i>et al.</i> , 2015
310	ARR1-arr1-3_rev	AATGTTATCGATGGAGTATGCGTCAAAGT	Zhang <i>et al.</i> , 2015
311	ARR10-arr10-5_for	CATTGGAGTGTGAGGGAGA	
312	ARR10-arr10-5_rev	CGATGATGAGACTGGTTGGA	
313	ARR12-arr12-1_for	TAACAACGACGAACCAAGCA	
314	ARR12-arr12-1_rev	TTGGCAGAGTCACAGAATGG	
315	LBa1-SALK	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
<i>rock2, rock3</i>			
263	rock2_for	TGGCTCAGAAATGGGGATA	263/264 → 256 bp (Wildtypallel wird von XbaI in 250 + 31 bp geschnitten)
264	rock2_rev	TGATGGCTTCATATAAAATATAACCACTCTA	
265	rock3_for	TTTTGCTGATTGTTGCTTACAG	265/266 → 595 bp (Mutantenallel wird von XapI (ApoI) in 459 + 136 bp geschnitten)
266	rock3_rev	CCTATCAAGAGGAATTGAGTGAGA	

Tab. S9: Sonstige Primer.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Nr.	Bezeichnung	Sequenz
Hefe-Kolonie-PCR			PCR, Sequenzierung		
519	pHIS1-HIS3_rev	GGGCTTCTGCTCTGTC	125	pDONR-P4P1R_for	CGGATTTGTCTACTCAGGAG
527	C115_for	AGAATCCCATCACAAAGTTTGAC	126	pDONR-P4P1R_rev	TGGCTCATAACACCCCTTG
525	pARR6-intern_for	CTTTGACTTTATTCGGTTTTTTG	145	attB2-qRT_rev	GCCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG
526	pARR6-intern2_rev	TGGTGGCAGTGGTTGGG	151	T-DNA-LB_rev	TCTAGTGGACTGATGGGCTG
502	pMIR172b-intern2_for	CACACTTCACCTTCTTCTTC	152	T-DNA-RB_for	TGAGATCTCTGTGGTTGGC
503	pMIR172d-intern_for	CTCTTCTATTCTTCAACTGG	154	pK7m24GW-attB2_rev	CACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG
506	pMIR172e-intern2_rev	TGATAACATCCACCAAAGG	172	LOG4_for	ATGGAGGTCAACAATGAAACC
522	pMIR172b-intern3_rev	CGAATCCAAGGGCTGA	173	LOG4_rev	TCAGTCTTCAGAAGAGTAGTCAATC
523	pMIR172d-intern3_rev	CCCTGAGATATGGACTCGT	190	p35S-intern_for	CAGTCTCAGAAGACCAAAGGG
524	pMIR172e-intern3_for	GCTTCTGTTCTGACACTTG	191	p35S-intern2_rev	GTTCTTGATGCAGTTAGTCTCTG
PCR, Sequenzierung			195	LOG4-intern_for	GCCGTTGAAGAAGGCTTC
21	attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT	203	GFP-intern2_rev	ATGCCACCTACGGCAAG
49	tdTomato_for	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	204	ARR1-intern_for	CCAGAACTCCCGTGAACAG
50	tdTomato_rev	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	205	SRDX_rev	AGCGAAACCCAAACGGAG
51	GUS-intern_for	GTCAATGTAATGTTCTGCGACGC	206	ARR1-intern2_rev	GCGTTACTCCCTTTAGAACCAC
52	Actin7_for	TACAACGAGCTTCGTGTTC	207	attB1_for	GTTTGTACAAAAAGCAGGCTATG
53	Actin7_rev	TCCACATCTGTTGGAAGGTG	208	attB1-2_for	GTACAAAAAGCAGGCTTGATG
54	M13_for	GTTGTAAAACGACGGCCAGT	210	attB1-3_for	TGTACAAAAAGCAGGCTAAATG
55	M13_rev	CGCAGGAAACAGCTATGACC	231	p35Smin-intern_for	GGAAGTTCATTTCAATTTGGAG
61	GFP-GUS-intern_rev	GGTTTCTACAGGACGTAACATGC	234	CKX1-intern2_rev	CCAGCATTAGATAGTGTACC
62	GFP-intern_for	GTACAACACTACAACGCCACAACG	240	pPDF1-intern_for	GGAGACAGCTTTCTCATACGC
63	GUS-intern2_rev	GGTGATGATAATCGGCTGATG	241	pPDF1-intern2_rev	GCAGGTGCATTTACACTATCC
67	CKX1-intern_for	GTTGGAGGTACACTATCTAATGC	246	pMIR165a-intern_for	CCCAACCACCTCTCTGACTAAC
73	Myc_rev	TTAGTACCCTTCAAGTCTTCC	247	pMIR165a-intern2_rev	GTTAGTCAAGAGTGGTTGGG
75	pDONR-seq_for	CGTTAACGCTAGCATGGATG	347	pPDF1-intern3_for	CCATTGCAACAACTTCTCTC
81	pATML1-intern_rev	CCACTGTGTGTGTGATTCC	348	pATML1-intern6_for	TAAAGAACTCCCTGAATCCAC
82	pATML1-intern2_for	GGATTATCGCTAACACACCC	349	pMIR165a-intern3_for	ATCTTCGTCTCCGCCACTC
83	pATML1-intern3_for	GGGGTACTACTGTCTAATCAGG	421	SPL9-spl9-4_rev	GCTCATTATGACCAGCGAGTC
84	pATML1-intern4_for	TGCTCCCCAACTACATTAGTC	444	MIM156_rev	TGACAGAAGATAGAAGTGAGC
85	pDONR-seq_rev	CTTGTGCAATGTAACATCAGAG	445	MIM172_rev	GAATCTGAACTCGATGCTG
92	GFP_rev	TCACTTGTACAGCTCGTCCATG	501	pMIR172b-intern_for	AGGTGAAAGTGTGGGAGAC
93	attR1_rev	CATAGTACTGCATATGTTGTG	502	pMIR172b-intern2_for	CACACTTCACCTTCTTCTTC
94	attL2_rev	CCAACCTTTGTACAAGAAAGCTG	503	pMIR172d-intern_for	CTCTTCTATTCTTCAACTTGG
107	attB4_for	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTC	504	pMIR172d-intern2_for	GAGACCCGATATAAATAGG
108	attB1_rev	GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGC	505	pMIR172e-intern_for	AGTGGTATAGAGGAACCTGTG
109	pATML1-intern5_for	GGACACACATGCAATCAATG	506	pMIR172e-intern2_rev	TGATAACATCCACCAAAGG
112	pATML1-neu-intern_for	GCTAGGGTTTCATTGTGTGC	522	pMIR172b-intern3_rev	CGAATCCAAGGGCTGA
123	pB7m34GW_for	CACATACAAATGGACGAACGG	523	pMIR172d-intern3_rev	CCCTGAGATATGGACTCGT
124	pB7m34GW_rev	CCTTATCTGGGAACTACTCACAC	524	pMIR172e-intern3_for	GCTTCTGTTCTGACACTTG

Vektorkarten



Fortsetzung nächste Seite.

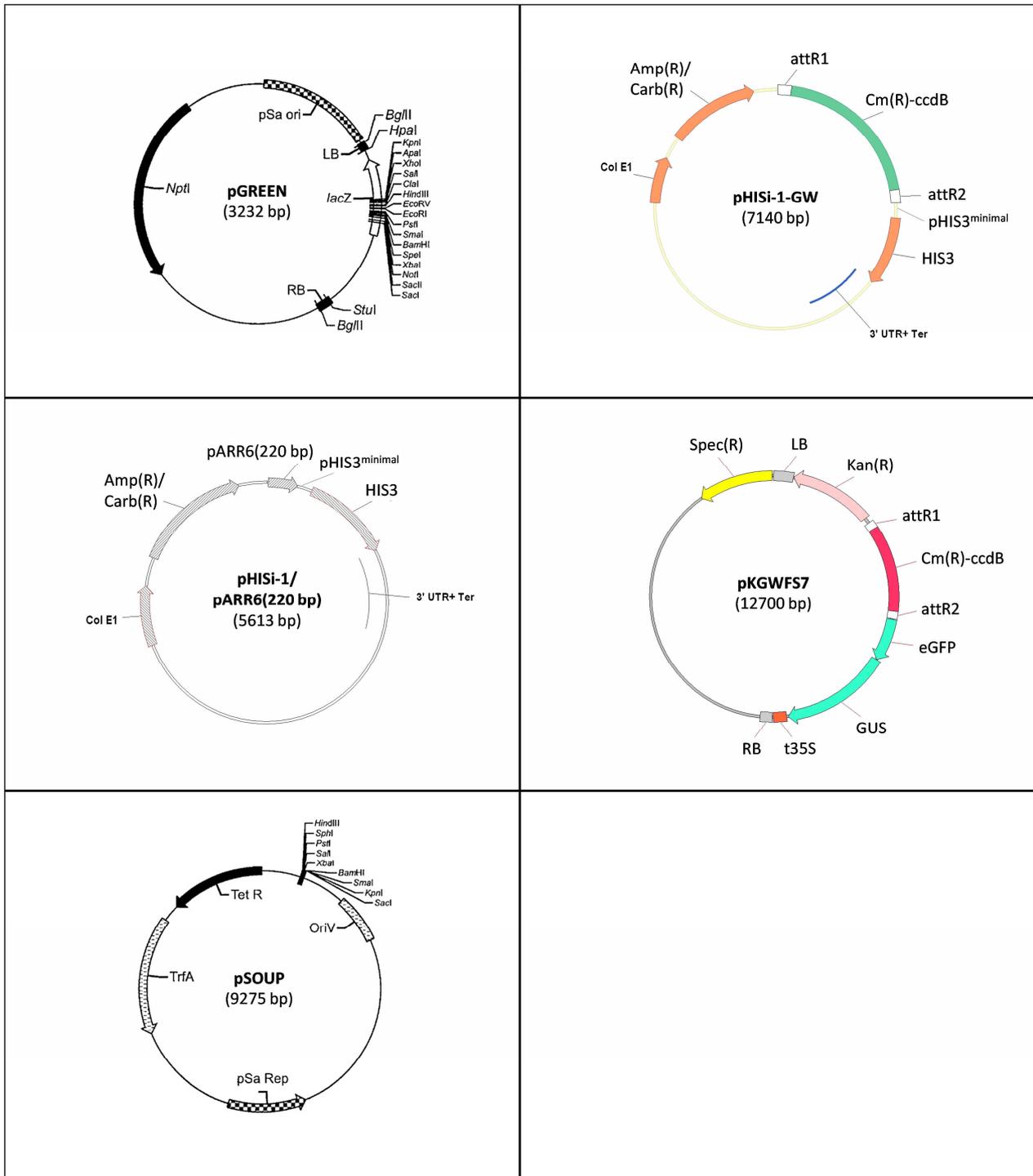


Abb. S1: Schematische Darstellung verwendeter Plasmide. Für weitere Informationen s. Tab. 11; die Vektorkarten von pGREEN und pSOUP entstammen Hellens *et al.* (2000), alle übrigen wurden mit VectorNTI (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) erstellt; Todesco *et al.* (2010) benutzten für die Expression der Zielgen-Mimikry-Konstrukte eine abgewandelte Form von pGREEN mit den Selektionsmarkern Spec^R (Bakterien) und Basta^R/PPT^R (Pflanzen).

Abkürzungen: AD = Aktivierungsdomäne, ADH = Alkoholdehydrogenase, att = *attachment site*, ccdB = *coupled cell division B*, LB = *left border*, Ori = *origin of replication* (Replikationsursprung), R = Resistenz, RB = *right border*.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Thomas Schmülling für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen, für die ständige Bereitschaft Fragen zu beantworten und die Freiheit, auch eigene Ideen zu verfolgen.

Prof. Dr. Wolfgang Schuster möchte ich nicht nur für die Zweitbegutachtung dieser Arbeit danken, sondern auch für die Unterstützung bei Computer- und Netzwerkproblemen sowie bei Fragen wissenschaftlicher Natur.

Dr. Isabel Bartrina danke ich für viele konstruktive Gespräche und Denkanstöße.

Ich danke meinen Studenten, vor allem Susanne Gerber und Jutta Hoffmann, für ihre großartige Hilfe im Labor!

Ich danke den Mitgliedern des Labors 109 und natürlich auch allen anderen Mitgliedern der Angewandten Genetik, sowohl des Alt- als auch des Neubaus, für die tolle Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden. Ein besonderer Dank geht an Jule, Alexis, Louisa und Johanne für Korrekturen, Ablenkungen und das Ertragen meiner Launen.