

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie



Organspezifische Bildung und Funktion von Oxylipinen in
Arabidopsis thaliana

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von
Wiebke Grebner
geboren in Solingen

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Gutachter: PD Dr. Susanne Berger

Gutachter: PD Dr. Rob Roelfsema

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Abkürzungsverzeichnis:

ABA	Abscisinsäure
ABC	ATP-bindende-Kassette
AOS	Allenoxidsynthase
AOC	Allenoxidcyclase
cDNA	komplementär DNA
Col-0	Columbia-0
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
dhJA	Dihydro-JA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-	negative Elektrospray-Ionisation
GLV	<i>Green Leaf Volatiles</i>
HODE	Hydroxy-Oktadekadiensäure, Hydroxyfettsäure
HOTE	Hydroxy-Oktadekatriensäure, Hydroxyfettsäure
HPODE	Hydroperoxy-Oktadekadiensäure, Hydroperoxyfettsäure
HPOTE	Hydroperoxy-Oktadekatriensäure, Hydroperoxyfettsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	JA-Isoleucin
JA-Nva	JA-Norvalin
LOX	Lipoxygenase
LSD	<i>least significant difference</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
μE	Mikroeinsteinstärke
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MRN	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
OD	optische Dichte
OPC (18:0)	3-Oxo-2-(2`-(Z)-pentenyl)-cyclopentan-1-octansäure
OPDA	12-Oxophytodiensäure
OPR	OPDA-Reduktase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR-Gene	Abwehrgene

PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interferenz
RT	Reverse Transkriptase
<i>RtS</i> -Gene	Wurzel zu Spross responsive-Gene
SDS	Natriumdodecylsulfat
STABW	Standardabweichung
TBS	Puffer-Saline
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
u	Enzymaktivität in <i>units</i>
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Massenverhältnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Oxylipine als Signalstoffe in Pflanzen	1
1.1.1	Reaktion und Funktion von Lipoxygenasen in Pflanzen	2
1.1.2	Die Biosynthese von Jasmonaten	3
1.1.3	Die vielfältigen biologischen Funktionen von Jasmonaten	7
1.2	Zielsetzung	13
2	Material	14
2.1	Chemikalien	14
2.2	Standardsubstanzen	14
2.3	Enzyme, weitere Materialien, Reagenzien und Kits	15
2.4	Laborgeräte	15
2.5	Nährmedien	17
2.6	Antibiotika	18
2.7	Lösungen und Puffer	18
2.8	Pflanzenmaterial	19
2.9	Bakterien	20
3	Methoden	21
3.1	Arbeiten mit Pflanzenmaterial	21
3.1.1	Anzucht von <i>Arabidopsis</i> Pflanzen auf Erde	21
3.1.2	Oberflächen-Sterilisation von <i>Arabidopsis</i> Samen	21
3.1.3	Hydroponische Anzucht von <i>Arabidopsis</i> Pflanzen	21
3.1.4	Verwundung	21
3.1.5	Sorbitol Behandlung	22
3.1.6	Trockenstress	22
3.1.7	Pfropfen von <i>Arabidopsis</i> Pflanzen	23
3.1.8	Agrobakterien vermittelte Pflanzentransformation	23
3.1.9	Selektion transgener <i>Arabidopsis</i> Pflanzen	24
3.2	Molekularbiologische Methoden	24
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	24
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	25
3.2.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	25
3.2.4	Isolation von Plasmid-DNA	26
3.2.5	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren	26
3.2.6	Gateway TM ®-Klonierung	26
3.2.7	Transformation von Bakterien	27
3.2.8	Kolonie PCR-Screen	27
3.2.9	Herstellung von Glycerin-Stocks	28
3.2.10	Sequenzierung von DNA-Abschnitten	28
3.2.11	Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial	28
3.2.12	Untersuchung der RNA Integrität	29
3.2.13	DNase-Verdau, Fällung der RNA und cDNA Synthese	29
3.2.14	Quantitative PCR	30
3.3	Proteinbiochemische Methoden	31
3.3.1	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	31
3.3.2	Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese	31
3.3.3	Elektrophoretischer Proteintransfer (Nass-Blot Verfahren)	32
3.3.4	Immunodetektion	32

3.4	Analytische Methoden	33
3.4.1	Extraktion und Analyse von Hydroxyfettsäuren	33
3.4.2	Extraktion und Analyse von Galaktolipiden	34
3.4.3	Extraktion und Analyse von Phytohormonen	36
3.5	Statistische Auswertung	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Untersuchung der Bildung von Oxylipinen in Spross und Wurzel von <i>Arabidopsis</i>	38
4.1.1	Lipid- und Oxylipinprofile von Wildtyp Blättern und Wurzeln	38
4.1.2	Die organspezifische Bildung von Jasmonaten nach Verwundung	42
4.2	Unterschiedliche Beteiligung von 13-Lipoxygenasen an der Jasmonatproduktion nach Stress	46
4.2.1	Expressionsanalyse von 13-Lipoxygenasen nach Verwundung	46
4.2.2	Jasmonatspiegel in verschiedenen 13-LOX-Mutanten nach Verwundung	47
4.2.3	Jasmonatspiegel nach Stress intakter Pflanzen	49
4.2.4	Jasmonat- und ABA-Spiegel nach osmotischem Stress	50
4.2.5	Jasmonat- und ABA-Spiegel nach Trockenstress	53
4.3	Bedeutung von Jasmonaten in der Wurzel von <i>Arabidopsis</i>	56
4.3.1	Trockenstress in Wildtyp und JA Biosynthese-Mutanten	56
4.3.2	Fütterung von <i>Porcellio scaber</i> mit Wildtyp und JA Biosynthese-Mutanten	60
4.4	Vorcharakterisierung von <i>LOX2</i> und <i>6</i> Überexpressionslinien	66
4.4.1	<i>LOX</i> Expression und Proteinnachweis in 35S::HA:: <i>LOX2</i> Linien	67
4.4.2	<i>LOX</i> Expression in 35S::HA:: <i>LOX6</i> Linien	68
5	Diskussion	69
5.1	Das Galaktolipid- und Oxylipinprofil von Wurzel und Spross in <i>Arabidopsis</i> ist unterschiedlich	69
5.2	Jasmonatproduktion in Wurzeln von <i>Arabidopsis</i>	71
5.2.1	Jasmonate werden in der Wurzel unabhängig vom Spross gebildet	72
5.2.2	Beteiligung von 13-Lipoxygenasen an der Bildung von Jasmonaten nach verschiedenen Stressen	74
5.2.3	Regulation der Jasmonat-Biosynthese nach Stress	75
5.2.4	Biologische Funktion von Oxylipinen in der Wurzel	78
5.3	Ausblick	83
6	Zusammenfassung	85
7	Summary	87
	Literaturverzeichnis	89
	Anhang	100

1 Einleitung

1.1 Oxylipine als Signalstoffe in Pflanzen

Oxylipine sind ubiquitär im Tier- und Pflanzenreich verbreitete Signalmoleküle mit vielfältigsten Funktionen und Strukturen. Ihr Vorkommen wird sowohl in Blütenpflanzen als auch in Algen, Moosen, Pilzen und Säugetieren beschrieben (Smith et al., 2000; Funk, 2001; Andreou et al., 2009; Koo and Howe, 2009; Brodhun and Feussner, 2011). Wie aus dem Namen dieser Molekülgruppe bereits zu erkennen ist, (oxy: griechischer Wortteil -> Sauerstoff enthaltend, Lipid: griechisch -> Fett), handelt es sich hierbei um oxidierte Fettsäuren. Aber auch deren Metabolite werden zu den Oxylipinen gezählt. Die Bildung von Oxylipinen kann in Pflanzen enzymatisch oder nicht-enzymatisch durch (Aut-) Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren erfolgen. Bei der nicht-enzymatischen Bildung ist besonders die Aktivität reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativer Stress beteiligt. Die unspezifische Oxidation der Haupt-Membranlipide von Pflanzen, α -Linolensäure (C18:3) und Linolsäure (C18:2) führt zu vielen verschiedenen Isomeren von Hydroperoxyfettsäuren (9-, 10-, 12-, 13-, 15-, 16-HPOTE/HPODE), welche als razemisches Gemisch in der R- und S-Konfiguration vorliegen (Berger et al., 2001; Spiteller et al., 2001; Mueller, 2004). Enzymatisch ist bisher hingegen nur die Bildung von 2-, 9- und 13-HPOTE bekannt. Aufgrund der Stereoselektivität der entsprechenden Enzyme, welche die Oxygenierung katalysieren, liegen diese in enantiomerenreiner R- oder S-Form vor. An der Bildung von 2-HPOTE sind sogenannte α -Dioxygenasen beteiligt. 9- und 13-HPOTE werden durch spezifische Lipoxygenasen (LOX) gebildet. (Hamberg et al., 1999; Feussner and Wasternack, 2002). Die instabilen HPOTEs können nach ihrer Entstehung zu stabilen Hydroxyfettsäuren (HOTEs) reduzieren oder zu anderen Oxylipinen metabolisieren. Dabei werden nicht-enzymatisch gebildete Oxylipine oft als toxische Nebenprodukte betrachtet. Jedoch können auch diese eine hohe biologische Aktivität aufweisen, wie etwa die Gruppe der Phytprostane. Für diese Verbindungen konnte gezeigt werden, dass sie die Regulation verschiedener Gene, darunter Stress-, Detoxifizierungs- und Sekundärmetabolismus-assoziierte Gene beeinflussen (Mueller, 2004; Mueller et al., 2008; Durand et al., 2009). Neben der nicht-enzymatischen Umwandlung von HPOTE gibt es auch verschiedene enzymatisch gesteuerte Wege. Dazu zählen unter anderem der Peroxygenase-Weg, welcher Epoxy- und Hydroxy-Derivate bildet, der Hydroperoxid-Lyase-Weg, welcher zur Bildung von Alkenalen und Oxo-Säuren führt und der Divinyl-Ether-Synthase-Weg, welcher verschiedene Ether, wie die Colneleinsäure bildet (Blee, 1998; Grechkin, 1998; Feussner and Wasternack, 2002). Diese hat einen lokalen und systemischen Effekt auf die Infektion von Gerste mit dem Mehltau Erreger *Blumeria graminis* (Cowley and Walters, 2005). Ein weiterer enzymatischer Biosyntheseweg,

welcher zu Jasmonaten als Endprodukt führt, ist der AOS-Weg (Wasternack and Kombrink, 2010). Die Biosynthese und Funktion von Jasmonaten, sowie die Reaktion und Eigenschaften verschiedener LOX Enzyme in Pflanzen, sollen in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

1.1.1 Reaktion und Funktion von Lipoxygenasen in Pflanzen

Wie bereits kurz vorgestellt, sind LOXen Enzyme, welche die stereospezifische Oxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren und damit am ersten Schritt zur Bildung verschiedener Oxylipine beteiligt sind. Neben der Dioxygenasereaktion, d.h. dem Übertragen von molekularem Sauerstoff - O₂ - auf Fettsäuren, können LOX Enzyme auch eine Hydroperoxidase Reaktion, also die sekundäre Umwandlung von Hydroperoxiden, und die Bildung von Epoxy-Leukotrienen katalysieren. Unter physiologischen Bedingungen spielt in Pflanzen jedoch die Dioxygenasefunktion die wichtigste Rolle (Hamberg and Samuelsson, 1967; Shimizu et al., 1984; Kuhn et al., 1991; Feussner and Wasternack, 2002). Strukturell gesehen handelt es sich bei LOX Enzymen um monomere, nicht-Häm-Eisen enthaltende Dioxygenasen mit einem Molekulargewicht von 90-110 kDa. Der katalytische Bereich befindet sich am C-Terminus und besteht hauptsächlich aus α -Helices (Liavonchanka and Feussner, 2006).

LOX Enzyme sind ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich verbreitet (Brash, 1999; Feussner and Wasternack, 2002). Da es große Unterschiede in der Selektivität und Substratspezifität von LOX Enzymen im tierischen und pflanzlichen System gibt, soll im Folgenden genauer auf das pflanzliche System eingegangen werden.

In Pflanzen bildet α -Linolensäure (C18:3), in ihrer mit Glycerolipiden und Phospholipiden veresterten Form, einen der Hauptbestandteile der Chloroplastenmembranen und stellt eines der wichtigsten Substrate von LOX Enzymen dar. Weiterhin werden auch die C18 Fettsäure Linolsäure (C18:2) und die C16 Fettsäure Hexadekatriensäure (C16:3) als Substrate verwendet und es wurde zudem gezeigt, dass auch die nicht in Pflanzen vorkommende Arachidonsäure (C20:4) durch pflanzliche LOXen umgesetzt werden kann (Weber et al., 1997; Feussner and Wasternack, 2002; Falcone et al., 2004; Bannenberget al., 2009). Eine Möglichkeit der Klassifizierung von LOX Enzymen in Pflanzen erfolgt anhand der Position des Kohlenstoff-Atoms einer C18 Fettsäure, an dem die Oxygenierung stattfindet. In Pflanzen unterscheidet man zwischen 9-LOX und 13-LOX Enzymen, von denen jeweils verschiedene Isoformen bekannt sind. So gibt es z.B. in *Arabidopsis* zwei spezifische 9-LOX Enzyme (LOX1 und LOX5) und vier spezifische 13-LOX Enzyme (LOX2, 3, 4 und 6) (Bannenberget al.,

2009). In Kartoffelpflanzen sind sogar 14 LOX codierende Gene bekannt (Liavonchanka and Feussner, 2006). In manchen Pflanzenarten, wie Kartoffel oder Soja, konnten auch duale LOX Enzyme identifiziert werden, die sowohl an Position C9 als auch C13 oxygenieren können (Hughes et al., 2001; Fukushige et al., 2005). Neben der Einteilung aufgrund ihrer Regiospezifität, können die verschiedenen pflanzlichen LOXen auch anhand ihrer Sequenzhomologien in zwei Gen-Unterfamilien eingeteilt werden. Zu Gruppe I werden LOX Gene ohne Signalpeptid gezählt. Diese weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie (>75%) auf. Zu Gruppe II gehören LOX Gene, bei denen eine putative Chloroplasten-Lokalisations-Sequenz identifiziert wurde. Diese Enzyme zeigen untereinander nur eine geringere Sequenzhomologie (~35%). In dieser Gruppe sind, bisher, nur 13-LOXen vertreten (Shibata et al., 1994; Feussner and Wasternack, 2002; Wasternack and Kombrink, 2010). Die Lokalisation der LOX Enzyme ist sehr variabel. So konnten bisher zytosolische, vakuoläre, plastidäre sowie membrangebundene LOXen identifiziert werden (Liavonchanka and Feussner, 2006).

1.1.2 Die Biosynthese von Jasmonaten

Jasmonate sind Oxylipine, welche in Pflanzen aus dem Produkt von 13-LOX Enzymen gebildet werden. Unter diesem Begriff werden die Jasmonsäure (JA), ihre Vorstufe 12-Oxophytodiensäure (OPDA) und deren Metabolite zusammengefasst (Turner et al., 2002). Die Grundlagen der JA-Biosynthese wurden bereits in den 1980er Jahren von Vick und Zimmerman, zunächst an *Vicia faba*, aufgeklärt (Vick and Zimmerman, 1983, 1984). Die ersten Schritte der Biosynthese finden in Plastiden statt (Abbildung 1.1). Hier wird zunächst, wie bereits erwähnt, α -Linolensäure durch 13-LOX Enzyme zu 13-HPOTE umgesetzt. Dabei wurde nach dem ursprünglichen Biosynthesemodell davon ausgegangen, dass membranständige α -Linolensäure durch verschiedene Phospholipasen aus den Membranen ausgeschnitten und so als freies Substrat zur Verfügung gestellt wird (Ishiguro et al., 2001; Zien et al., 2001; Yang et al., 2007). Alternativ wurde gezeigt, dass auch an Membranlipide veresterte C18-Fettsäuren direkt oxidiert werden können, ohne vorher freigesetzt zu werden (Buseman et al., 2006; Kourtchenko et al., 2007). Im nächsten Schritt des Biosynthesewegs wird 13-HPOTE durch das Enzym Allenoxidsynthase (AOS) zu dem instabilen Epoxid Allenoxid dehydratisiert. Dieses kann anschließend entweder nicht-enzymatisch zu α - und γ -Ketolen gespalten werden oder durch das Enzym Allenoxidcyclase (AOC) stereospezifisch zu *cis*-(+)-OPDA umgesetzt werden (Hamberg and Fahlstadius, 1990). In *Arabidopsis* sind vier Gene bekannt, die je eine AOC codieren. Diese tragen alle eine Chloroplasten-Zielsequenz (Stenzel et al., 2003). Die entstandene OPDA wird nun, über einen nicht genauer bekannten Mechanismus, aus den Chloroplasten in die Peroxisomen transportiert. Eine Möglichkeit für den Transport von OPDA in die Peroxisomen ist der

Weg über den ATP-bindende-Kassette (ABC)-Transporter COMATOSE, da dessen knockout Mutante verminderte JA-Spiegel zeigt (Theodoulou et al., 2005). In den Peroxisomen erfolgt die Reduktion des Cyclopentenons OPDA durch die OPDA-Reduktase3 (OPR3) weiter zu dem Cyclopentanon 3-Oxo-2-(2`-(Z)-pentenyl)-cyclopentan-1-octansäure (OPC (8:0)). In *Arabidopsis* sind fünf Isoformen der OPR bekannt (Tani et al., 2008). Für die OPR1 und -2 konnte gezeigt werden, dass sie keine Peroxisomen-Zielsequenz tragen und vermutlich nicht an der Umsetzung von OPDA beteiligt sind (Schaller et al., 2000). Der letzte Schritt im Biosyntheseweg von JA ist eine durch mehrere Enzyme gesteuerte, dreimalige β -Oxidation der Carboxylsäure-Seitenkette der OPC (8:0) und führt zu (+)-7-*iso*-JA. Davon ausgehend stellt sich ein auf der Seite der Isoform (-)-JA liegendes Gleichgewicht ein (Delker et al., 2006). (-)-JA wird als die aktivere Substanz als (+)-7-*iso*-JA beschrieben (Wasternack and Kombrink, 2010). Neben der Bildung von OPDA aus α -Linolensäure wird in *Arabidopsis* zusätzlich die ebenfalls plastidär vorliegende Hexadekatriensäure (C16:3) zu dinorOPDA (dnOPDA) umgewandelt. Die dnOPDA wird, ebenso wie OPDA, in den Peroxisomen zur JA-Biosynthese verwendet (Weber et al., 1997).

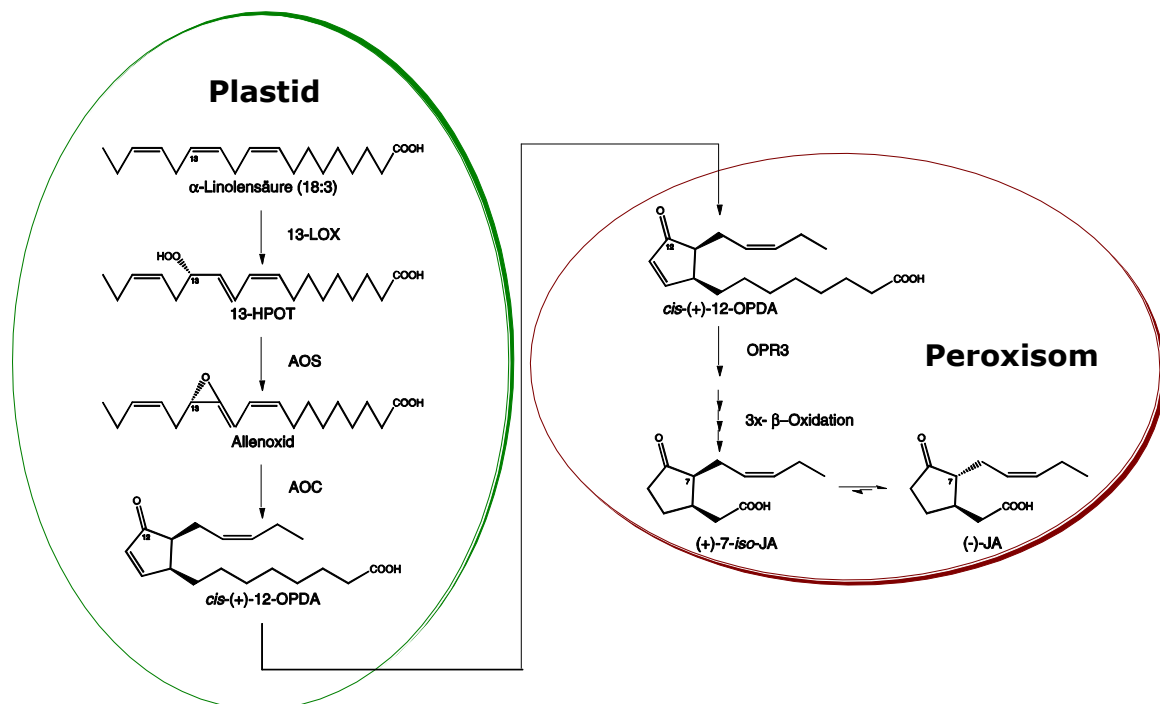


Abbildung 1.1 Der Biosyntheseweg von JA. Verändert nach Delker et al., 2006.

JA kann nach ihrer Bildung in vielfältiger Weise weiter metabolisiert werden. Zu diesen Metaboliten zählen der flüchtige Methyl ester Methyljasmonat (MeJA) und das Aminosäurekonjugat JA-Isoleucin (JA-Ile). Neben JA-Ile können auch andere Aminosäuren, wie Tryptophan, Tyrosin oder Valin an JA konjugiert werden (Piotrowska and Bajguz, 2011). Zudem gibt es decarboxylierte, hydroxylierte und glycosylierte

Formen von JA (Turner et al., 2002; Browse, 2009). Die Biosynthese von JA-Ile erfolgt in *Arabidopsis* durch das Enzym JAR1 (Staswick et al., 2002; Suza and Staswick, 2008). *jar1* KO Mutanten zeigen keine typischen JA Antworten mehr. Weiterhin ist bekannt, dass auch die *coi1* Mutante nicht sensitiv auf Jasmonat-Behandlung reagiert (Feys et al., 1994). Bei COI1 handelt es sich um einen JA-Ile Rezeptor. COI1 ist ein F-Box Protein, welches Bestandteil des sogenannten SCF^{coi1}-Komplex, einer E₃ Ubiquitin-Ligase, ist. Bei Anwesenheit von JA-Ile bindet dies an COI1 und vermittelt so die Bindung des SCF^{coi1}-Komplex an sogenannte JAZ-Repressoren und deren Degradation über das 26S-Proteasom. JAZ-Repressoren inhibieren die Expression unterschiedlichster JA- responsiver Gene, so dass durch ihren Abbau erst die Jasmonat-Antwort der Pflanze stattfinden kann (Reviewed in Browse, 2009; Acosta and Farmer, 2010; Wasternack and Kombrink, 2010). Aus diesem Grund wird JA-Ile als biologisch aktive Form der JA angesehen (Staswick et al., 1998; Staswick and Tiryaki, 2004; Browse, 2009). Es konnte zudem gezeigt werden, dass es durch Epimerisierung der aktiven (+)-7-*iso*-JA-Ile Form zu (-)-7-*iso*-JA-Ile zu einer Inaktivierung der biologischen Aktivität von JA-Ile kommt (Fonseca et al., 2009).

In den letzten Jahren konnten neben freien Jasmonaten auch an membranständige Mono- und Digalaktosyldiacylglycerole (MGDGs und DGDGs) veresterte OPDA und dnOPDA identifiziert werden. MGDGs und DGDGs sind Galaktolipide, welche aus einem bzw. zwei Galaktosemolekülen aufgebaut sind, welche an *sn*-3-Position mit einem Glycerol verbunden sind. Diese Galaktolipide sind normalerweise an *sn*-1 und *sn*-2 Position mit jeweils einer Fettsäure verestert. (Holzl and Dormann, 2007). Mit C18:3 oder C18:3 und C16:3 veresterte Galaktolipide bilden den Haupt-Bestandteil plastidärer Membranen (Routaboul et al., 2000). In Abbildung 1.2 ist exemplarisch die Strukturformel des MGDG-18:3-16:3 gezeigt.

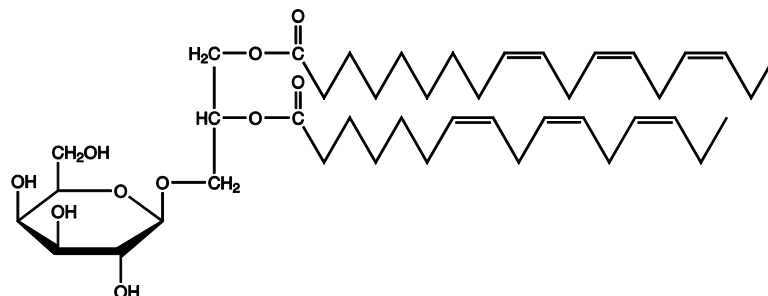


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des MGDG-18:3-16:3.

Ist nun anstelle der Fettsäuren OPDA oder dnOPDA mit dem Glycerol oder direkt mit der Galaktose verestert, werden diese Moleküle, aufgrund ihrer Entdeckung in *Arabidopsis*, als Arabidopside bezeichnet. Ihr Vorkommen konnte bisher nur für *Arabidopsis thaliana*

und *Arabidopsis arenosa* nachgewiesen werden. In anderen Pflanzenarten ist ihr Vorkommen bisher nicht beschrieben. Es sind sechs verschiedene Arabidopside bekannt, von denen sich vier von MGDGs und zwei von DGDGs ableiten (Bottcher and Weiler, 2007; Kourtchenko et al., 2007; Mosblech et al., 2009). Wie anhand des schematischen Aufbaus der Arabidopside in Abbildung 1.3 zu sehen ist, kann die Veresterung der Galaktolipide mit OPDA und dnOPDA in verschiedenen Varianten vorkommen (Kourtchenko et al., 2007). Entweder ist OPDA an *sn-1* und *sn-2* Position verestert (Arabidopside B, D und G), oder OPDA befindet sich an *sn-1*-Position und dnOPDA an *sn-2*-Position (Arabidopside A, C und E). Zudem ist bei Arabidopsid E und G jeweils noch ein OPDA-Molekül direkt an die Galaktose gebunden. Bisher wurde das Vorkommen der verschiedenen Arabidopside in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten beschrieben (Bottcher and Weiler, 2007). Hinsichtlich der Biosynthese wird diskutiert, ob die Bildung von OPDA und dnOPDA direkt an den veresterten Fettsäuren der membranständigen MGDGs und DGDGs erfolgt oder ob diese nachträglich in die Membranlipide eingebaut werden. In neueren Untersuchungen konnte, anhand von Fütterungsexperimenten, gezeigt werden, dass OPDA und dnOPDA tatsächlich an noch veresterten Fettsäuren gebildet werden können (Nilsson et al., 2012). In *Arabidopsis* wurde bisher einzig für die LOX2 eine Beteiligung an der Biosynthese von Arabidopsiden gezeigt. In den entsprechenden Arbeiten gibt es, aufgrund der Verhältnisse von freier zu veresteter OPDA/dnOPDA, ebenfalls Hinweise darauf, dass die Synthese von Arabidopsiden durch die LOX2 an den veresterten Fettsäuren geschieht, dies ist jedoch bisher nicht genau geklärt (Glauser et al., 2009; Seltmann, 2010; Zoeller et al., 2012).

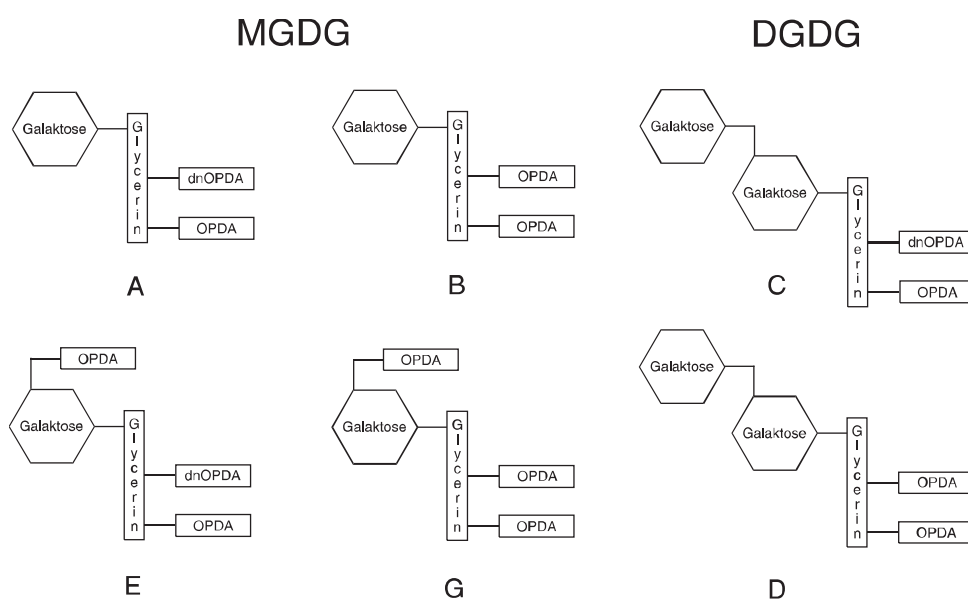


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung von Arabidopsiden. Die Arabidopside A, B, E und G stammen von MGDGs ab, die Arabidopside C und D von DGDGs.

1.1.3 Die vielfältigen biologischen Funktionen von Jasmonaten

Sowohl Untersuchungen von Jasmonat-Biosynthese- und Signalmutanten, als auch die exogene Behandlung mit Jasmonaten, haben in verschiedenen Pflanzenarten, wie *Arabidopsis* oder Tomate, viel zur Aufklärung der Funktion verschiedener Jasmonate in Entwicklungs-, Stress- und Abwehrprozessen beigetragen. Eine Übersicht dazu ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Hinsichtlich der vielfältigen Funktionen von Jasmonaten ist besonders über die oberirdischen Pflanzenorgane viel bekannt, es gibt hingegen nur wenige Studien, die sich mit dem Einfluss von Jasmonaten auf die Wurzeln von Pflanzen beschäftigen. Im folgenden Kapitel sollen einige der wichtigsten biologischen Funktionen der Jasmonate im Spross und den Wurzeln vorgestellt werden.

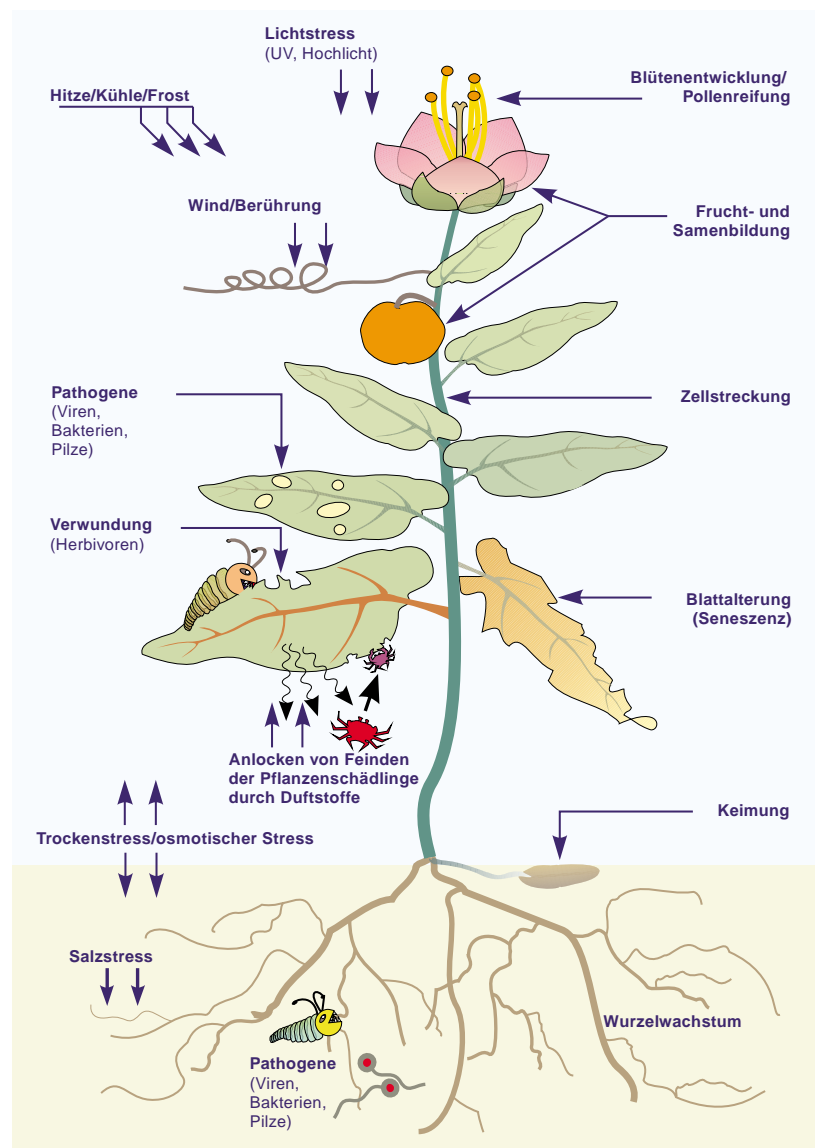


Abbildung 1.4 Beteiligung von Jasmonaten als Signalmoleküle bei pflanzlichen Entwicklungs-Prozessen (rechte Seite) und Stress-Reaktionen (linke Seite). (Copyright (2012) Wiley. Verwendet mit Genehmigung von: Wasternack and Hause, 2000)

Jasmonate werden immer wieder mit verschiedenen Entwicklungsprozessen in Pflanzen in Verbindung gebracht. Dazu zählen die Blüten-, Wurzel- und die Fruchtentwicklung, sowie Seneszenz-Prozesse. So ist bekannt, dass Jasmonat-Biosynthese- und Signal-Mutanten männlich sterile Blüten besitzen. Diese Sterilität wird durch drei Faktoren bestimmt. Erstens wachsen die Antheren-Filamente nicht weit genug über den Stempel der Blüte hinaus, um eine Selbst-Bestäubung (die übliche Form der Bestäubung bei *Arabidopsis*) zu ermöglichen. Zweitens reißen die Pollensäcke nicht zum rechtzeitigen Zeitpunkt der Bestäubung auf und drittens sind die sich entwickelnden Pollenkörner zum größten Teil nicht fruchtbar. Dieser Phänotyp kann jedoch, in Biosynthese-Mutanten, durch exogene Applikation von Jasmonaten aufgehoben werden (Browse, 2009; Acosta and Farmer, 2010). Zu diesen Mutanten zählen auch die *dde2* Mutante, und die *fad3/7/8* Mutante. Die *dde2* Mutante trägt einen Defekt im AOS Gen des JA-Biosynthesewegs. Da es nur eine Isoform des AOS Gens in *Arabidopsis* gibt, besitzt diese Mutante keinerlei Jasmonate mehr (von Malek et al., 2002). Die *fad3/7/8* Mutante hingegen besitzt so gut wie keine dreifach-ungesättigten Fettsäuren mehr und kann aus diesem Grund keine Jasmonate bilden. In dieser Mutante können, aufgrund der fehlenden dreifach-ungesättigten Fettsäuren, jedoch auch eine ganze Reihe weiterer Oxylipine, wie HOTES, nicht gebildet werden (McConn and Browse, 1996). Die Jasmonat-Rezeptormutante *coi1* ist ebenfalls von dieser Sterilität betroffen, ihr Phänotyp kann jedoch nicht durch die exogene Jasmonat-Applikation aufgehoben werden (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998). Für die 4 unterschiedlichen 13-LOX-Isoformen, die in *Arabidopsis* bekannt sind, konnten unterschiedliche Effekte auf die Fertilität der KO Mutanten gezeigt werden. So sind die jeweiligen 13-LOX Einzelmutanten alle fertil, jedoch weist eine *lox3/4* Doppelmutante den männlich sterilen Phänotyp auf. Dies zeigt, dass die verschiedenen LOX-Isoformen untereinander nur zu einem bestimmten Maße redundant sind (Caldelari et al., 2011). Anders als bei *Arabidopsis* zeigen Tomaten Jasmonat Signal-Mutanten einen weiblich sterilen Phänotyp (Li et al., 2004). Dies verdeutlicht, wie vielfältig diese Signalmoleküle in unterschiedlichen Pflanzenarten wirken können.

Hinsichtlich der Bedeutung von Jasmonaten in der Wurzelentwicklung sind bisher besonders Effekte durch exogene Applikation beschrieben worden. So ist bekannt, dass die Gabe von bereits geringen Mengen Jasmonaten, wie JA, MeJA oder OPDA zu einem verkürztem Wurzelwachstum führt (Yamane et al., 1981; Staswick et al., 1992; Mueller et al., 2008). Dies geschieht durch eine Hemmung des Streckungswachstums der einzelnen Wurzelzellen (Wasternack and Hause, 2000). Neben Jasmonaten können auch andere Oxylipine, wie 9-HOTE oder einige Phytoprostane, ein verkürztes Wurzelwachstum hervorrufen (Vellosillo et al., 2007; Mueller et al., 2008). In Tabak Keimlingen konnte zudem ein reduziertes Wurzelwachstum nach Verwundung der

Blätter beobachtet werden, welches mit JA in Verbindung gebracht wurde (Hummel et al., 2007; Hummel et al., 2009). Eine Verkürzung der Wurzeln wurde in *Arabidopsis* Keimlingen zwar durch Behandlung der Blätter mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* ebenfalls erreicht, konnte jedoch nicht mit JA in Zusammenhang gebracht werden (Schmidt et al., 2010). Daher bleibt es weiterhin fraglich, ob auch endogene Jasmonate an der Regulation der Wurzellänge beteiligt sind. Neben der Regulation der Wurzellänge wurde auch gezeigt, dass Jasmonate die Bildung von lateralen Wurzeln in Reis und *Arabidopsis* fördern können (Wang et al., 2002; Hsu et al., 2012; Raya-Gonzalez et al., 2012).

Da sowohl bei der Fruchtentwicklung verschiedener Früchte als auch bei Seneszenz-Prozessen in Pflanzen Jasmonat-Anstiege verzeichnet werden können, wird immer wieder diskutiert, welche Funktion Jasmonate in diesem Zusammenhang einnehmen (Fan et al., 1997; Kondo et al., 2000; He et al., 2002; van der Graaff et al., 2006). Für klimakterische Früchte, bei denen der Reifungsprozess durch Ethylen gesteuert wird, wird postuliert, dass ein Anstieg von JA die Bildung von Ethylen und damit die Fruchtreifung fördert (Fan et al., 1998). Neueste Studien deuten zudem darauf hin, dass es eine Ethylen unabhängige Förderung der Carotinoid Biosynthese durch Jasmonate im Reifungsprozess von Tomaten gibt (Liu et al., 2012). Eine weitere Funktion von Jasmonaten während der Fruchtentwicklung könnte die Stimulation der Zellteilung sein, wie 2001 gezeigt wurde (Kondo and Fukuda, 2001). Hinsichtlich der Funktion von Jasmonaten in Seneszenz-Prozessen gibt es ebenfalls vielfältige Beobachtungen. So wurde gezeigt, dass die exogene Applikation von Jasmonaten eine Seneszenz-fördernde Wirkung auf die Blätter verschiedener Pflanzen hat (Ueda and Kato, 1980; Weidhase et al., 1987; He et al., 2002). Neuere Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass endogene Jasmonate keinen Einfluss auf die natürliche Seneszenz nehmen (Seltmann et al., 2010).

Neben den unterschiedlichen Einflüssen von Jasmonaten auf die Entwicklung von Pflanzen, sei es nun endo- oder exogen, gibt es eine noch größere Vielzahl von Studien in Hinblick auf die Beteiligung dieser Signalmoleküle an der Reaktion von Pflanzen auf biotische und abiotische Stresse. Im Folgenden soll eine Übersicht über die Bedeutung von Jasmonaten als Signale in der Reaktion von Pflanzen auf Verwundung und Pathogen-Befall, Kälte, Salzstress und osmotischem-Stress sowie auf Trockenheit gegeben werden.

Verwundung bedeutet für eine Pflanze immer die Gefahr des Befalls mit Pathogenen. Sei es nun, dass der Verwundungsreiz selbst durch einen herbivoren Schädling wie Raupen ausgelöst wurde, oder dass mechanische Verwundung, etwa durch Wind, den

Befall der Wundungsstelle mit pathogenen Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilzen ermöglicht. Die Entdeckung von Jasmonaten als wichtige Mediatoren in der Wundantwort von Pflanzen begann bereits in den frühen 90er Jahren. Dort wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass ein durch Verwundung hervorgerufener Anstieg der endogenen Jasmonate oder auch die Behandlung von Pflanzen mit MeJA die Expression verschiedener verwundungsassoziierter Gene reguliert (Farmer and Ryan, 1990; Mason and Mullet, 1990; Creelman et al., 1992). Weitere Untersuchungen zeigten, dass der durch Verwundung in Blättern ausgelöste Jasmonat-Anstieg weitreichende Effekte auf die Pflanze hinsichtlich verschiedener Abwehrstrategien gegen Herbivore oder Pathogene besitzt. So wird z.B. die Biosynthese verschiedener Sekundär-Metabolite, wie Proteinase-Inhibitoren oder Glukosinolate induziert (Farmer and Ryan, 1990; Pauwels et al., 2009). Auch wird die Genexpression, hinsichtlich der Expression unterschiedlicher Abwehrgene (PR-Gene), modifiziert. So werden bei Pathogenbefall etwa Defensine und Thionine gebildet, welche an der Abwehr von Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen beteiligt sind (Bohlmann et al., 1998; Wasternack and Hause, 2000). Weitere Mechanismen sind die Bildung verstärkter mechanischer Barrieren, wie Trichome, oder ein reduziertes Wachstum der oberirdischen Pflanzenorgane (Yan et al., 2007; Zhang and Turner, 2008; Yoshida et al., 2009). All diese Maßnahmen dienen dazu, die Pflanze vor Schädlingen zu schützen, bzw. die Fitness der Schädlinge zu reduzieren. So kann die verstärkte Trichom Bildung als physikalische Barriere gegen Herbivore dienen und die Bildung toxischer Sekundär-Metabolite kann zu einem verringerten Wachstum und verringerter Vermehrung der Schädlinge führen. In Wurzeln ist bekannt, dass Jasmonate eine Rolle in der Abwehr gegen verschiedene im Boden lebende Organismen spielen. So sind Pflanzen mit Defekten in der JA-Biosynthese oder Signaltransduktion empfindlicher gegen den Befall mit z.B. den Oomyceten *Pythium* oder *Phytophthora* und auch Nematoden (Vijayan et al., 1998; Attard et al., 2010; Nahar et al., 2011; Yan et al., 2012).

Je nach Standort können Pflanzen neben Schädlingen bzw. Pathogenen, also biotrophen Faktoren, auch abiotischen Stressen wie Kälte, Salzstress, osmotischem-Stress oder Trockenheit ausgesetzt sein. Auch hierbei konnten bereits Einflüsse von Jasmonaten und daraus resultierende Signalfunktionen in Blättern und zum Teil auch in Wurzeln, beschrieben werden. So ist bekannt, dass die Behandlung von verschiedenen Früchten wie Bananen, Granatäpfeln oder Tomaten mit MeJA deren Kältetoleranz während der Lagerung erhöht (Fung et al., 2006; Zolfagharinasab and Hadian, 2007; Zhao et al., 2012). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die MeJA Behandlung von Tomaten die Bildung verschiedener PR-Proteine induziert, welche an der Kältetoleranz beteiligt sind (Ding et al., 2002). Neben den Effekten durch exogene Behandlung von Pflanzen mit MeJA zeigt eine neuere Studie einen Zusammenhang

zwischen der JA-Biosynthese und der Kälteinduzierten Transkription von ω -3-FAD Genen, welche an der Bildung dreifach ungesättigter Fettsäuren (wie α -Linolensäure) beteiligt sind, auf. So wird ein *feed-forward*-Zyklus zwischen der JA-Synthese und Genexpression diskutiert (Shi et al., 2011).

Zu hohe Salzkonzentrationen in landwirtschaftlich genutzten Böden sind ein immer weiter verbreitetes Problem. So sind bereits mehr als 800 Millionen Hektar Land auf der Welt davon betroffen (Qadir et al., 2007). Toleranz von Pflanzen gegen Salzstress ist demnach ein wichtiger wirtschaftlicher Faktor. Verschiedene Studien zeigen, dass Jasmonate in der Reaktion von Pflanzen auf erhöhte Salzkonzentrationen beteiligt sind. So induziert JA in Reis-Wurzeln die Expression verschiedener Gene, welche auch bei Salzstress eine Rolle spielen (Moons et al., 1997). Es wurde zudem gezeigt, dass Jasmonate die Salz-Toleranz von Weinpflanzen positiv beeinflussen und die Zunahme der JA-Konzentrationen, der LOX- Aktivität und der Lipidperoxidation nach Salzstress in verschiedenen Pflanzen wie Tomate oder Madagaskar-Immergrün wurde beschrieben (Molina et al., 2002; Pedranzani et al., 2003; Elkahoui et al., 2005; Ismail et al., 2012).

Die Behandlung von Pflanzen mit Sorbitol löst einen starken osmotischen Stress aus, welcher sich durch Seneszenz-Symptome wie Chlorophyll-Abbau und Welken der behandelten Pflanzen äußert. In mit Sorbitol-Lösung behandelten Blättern von *Arabidopsis*- und Gersten- Pflanzen konnten in mehreren Studien, einige Stunden nach der Behandlung, sehr starke Anstiege von Jasmonaten verzeichnet werden (Lehmann et al., 1995; Kramell et al., 2000; Seltmann et al., 2010). Es wird in der Literatur unter anderem diskutiert, ob der Anstieg von JA als Folge von osmotischem Stress an der Bildung von Hydroxyzimtsäure-Amiden beteiligt ist (Ogura et al., 2001). Hydroxyzimtsäure-Amide sind Sekundär-Metabolite denen vielfältige Funktionen, besonders in Entwicklungs-Prozessen von Pflanzen, nachgesagt werden (Facchini et al., 2002). Hinsichtlich der Seneszenz-Symptome ist bekannt, dass, im Gegensatz zur natürlichen Seneszenz, der Sorbitol-Phänotyp in LOX2 RNAi Pflanzen nahezu aufgehoben werden kann. Demnach gibt es starke Unterschiede in der Signal-Funktion von Jasmonaten zwischen natürlichen Entwicklungsprozessen und Stress-Antworten (Seltmann et al., 2010). Wie bereits erwähnt, führt der durch Sorbitol ausgelöste, osmotische Stress bei Pflanzen zu deutlichen Welke-Erscheinungen, wie sie auch bei Trockenheit vorkommen. Eines der wichtigsten Signalmoleküle in Pflanzen als Reaktion auf Trockenheit ist Abscisinsäure (ABA). ABA beeinflusst das Schließen der Spaltöffnungen, um den Wasserverlust durch Transpiration zu verringern. Dabei wird durch Aktivierung von Anionen-Kanälen und Änderung des osmotischen Potentials der Schließzellen, besonders durch Kalium-Auswärts-Ströme, ein Turgorverlust der Schließzellen und damit der Spaltöffnungs-Schluss erreicht (Campbell and Reece, 2003;

Wasilewska et al., 2008). Neben ABA gibt es auch verschiedene Studien darüber, dass andere Signalmoleküle, wie Gibbellerine, Brassinosteroide, Salicylsäure, Cytokinine und auch Jasmonate am Spaltöffnungs-Schluss beteiligt sind (Acharya and Assmann, 2009). Hinsichtlich der Jasmonate ist unter anderem bekannt, dass viele durch Trockenheit regulierte Gene auch durch MeJA reguliert werden und eine Verlinkung von MeJA- und ABA-Signalwegen in Geleitzellen wird diskutiert (Huang et al., 2008; Munemasa et al., 2011). In Bezug auf Trockenheit und Jasmonate in Wurzeln wurde in einer Studie von 2012 gezeigt, dass ein Anstieg von JA in den Wurzeln von Zitruspflanzen nach Trockenheit nötig ist, um in diesen Pflanzen auch einen ABA-Anstieg zu erreichen (de Ollas et al., 2012).

1.2 Zielsetzung

Die Biosynthese und Bedeutung von Oxylipinen, besonders von Jasmonaten, als Signalmoleküle in Entwicklungs-, Stress- und Abwehr-Prozessen ist in Pflanzen vor allem in den überirdischen Pflanzenteilen bereits sehr gut untersucht. Über deren Bildung und Funktion in Wurzeln ist hingegen noch sehr wenig bekannt. Viele der Oxylipin-Biosynthese-Gene in *Arabidopsis* zeigen starke Expressions-Unterschiede in Spross und Wurzel. So ist etwa das 9-LOX Gen *LOX1* stark in der Wurzel exprimiert, das 13-LOX Gen *LOX2*, sowie andere Gene des JA-Biosynthesewegs, zeigen hingegen eine sehr hohe Expression im Spross (Hruz et al., 2008).

Um zu klären ob sich die unterschiedlichen Expressionsmuster von Oxylipin-Biosynthese-Genen in Spross und Wurzel auch in den Oxylipin-Gehalten der unterschiedlichen Organe von *Arabidopsis* Pflanzen widerspiegeln, sollten in der vorliegenden Arbeit die Gehalte verschiedener Oxylipine in Spross und Wurzel von *Arabidopsis thaliana* vergleichend untersucht werden. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf die Gruppe der der Jasmonate gelegt. Da Jasmonate in der Wurzel detektiert werden konnten, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, speziell die Bildung von Jasmonaten in der Wurzel basal und nach verschiedenen Stressen zu untersuchen. Zum einen sollte durch Pfropfungsexperimente geklärt werden, ob die Jasmonatproduktion in Wurzeln von *Arabidopsis* unabhängig vom Spross erfolgt, zum anderen wurde geplant, mit Hilfe verschiedener LOX-Mutanten zu klären, welche der vier bekannten Isoformen der 13-LOX Enzyme in *Arabidopsis* an der Jasmonatproduktion in der Wurzel beteiligt sind. Diese Fragestellung war deshalb interessant, da bereits in der Vergangenheit Untersuchungen verschiedener 13-LOX Mutanten zeigten, dass die verschiedenen Isoformen in unterschiedlichem Maß an der Jasmonatproduktion bei Entwicklungs- und Stress-Prozessen von *Arabidopsis* beteiligt sind (Bell et al., 1995; Caldelari et al., 2011).

Über die biologischen Funktionen, besonders von endogen gebildeten Jasmonaten, ist in der Wurzel bisher ebenfalls sehr wenig bekannt. Daher lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung ob und wenn ja bei welchen Prozessen in der Wurzel gebildete Jasmonate eine Funktion einnehmen. Dazu sollten Experimente hinsichtlich der Resistenz verschiedener Jasmonat-Biosynthese-Mutanten gegenüber unterschiedlichen Stressfaktoren, wie Trockenheit oder der Abwehr der Pflanzen gegen saprobionte Organismen, durchgeführt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Glykogen	Fermentas, St. Leon-Roth
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore, Schwalbach
Murashige & Skoog (MS) Salze	Duchefa, Haarlem, NL
peqGOLD Universal-Agarose	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Phyto-Agar	Duchefa, Haarlem, NL
Saccharose	Südzucker International, Ochsenfurt
Silwet® L-77	Leu+Gygax, Birmenstorf AG, Schweiz
X-Ray Entwickler XL 24	Kodak, Stuttgart
X-Ray Fixierer Al 4	Kodak, Stuttgart

Alle nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Standardsubstanzen

15-HEDE	C. Triantaphylides, Commissariat a l`Energie Atomique, Cadarache, Frankreich
[¹⁸ O] ₂ -OPDA	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
D6-ABA	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
DGDG-18:0-18:0	Matreya LLC, Pleasant Gap, USA
dhJA	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
MGDG-18:0-18:0	Matreya LLC, Pleasant Gap, USA
JA-Nva	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg

2.3 Enzyme, weitere Materialien, Reagenzien und Kits

Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
BP-Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
DNase-I, RNase-frei	Fermentas, St. Leon-Roth
dNTP Set molecular biology grade	Fermentas, St. Leon-Roth
GeneRuler™-100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
GeneRuler™-1kbp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
LR-Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase RNase	
H Minus, Point Mutant	Promega, Mannheim
NucleoSpin Extract II	Macherey und Nagel, Düren
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
peqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Pfu DNA Polymerase (recombinant, 2,5 u/μl)	Fermentas, St. Leon-Roth
TrueStart™ Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 u/μl)	Fermentas, St. Leon-Roth

2.4 Laborgeräte

Absorptionsmessung	NANODROP 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA; Software: ND-1000 V3.5.2 MRX _{TC} Revelation, Dynex technologies, Berlin
Analysenwaage	BP211D und Laborwaage 1600, Sartorius, Göttingen
Autoklav	Tuttnauer Systec 5075ELV, New York, USA
Durchmischung	Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA
Elektrophorese (horizontal)	Werkstatt des Julius-von-Sachs-Instituts, Würzburg
Elektrophorese (vertikal)	PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Geldokumentation	UV-Systeme, INTAS, Ahmedabad, India
Klimaschrank	AR-36L3, Percival Scientific, USA
Kühl-und Gefrierschränke	-20°C Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen -80°C Gefrierschrank, New Brunswick Scientific, Nürtingen
Massenspektrometer	Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer, Waters Micromass, Milford, USA

Mikroskop	Leica EZ4D Stereomikroskop, Leica Camera AG, Solms
Pipetten	0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl Einkanalpipetten Eppendorf Research Variabel, Eppendorf, Hamburg
PCR-Geräte	Mastercycler® ep realplex S, Eppendorf, Hamburg CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, München
pH-Meter	HI 9321 microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Probenkonzentrierung	Rotationsvakuumkonzentrator RVC 2-18 und RVC 2-25, Heraeus-Christ, Osterode mit Membranvasuumpumpe MZ 2C, Vakuubrand, Wertheim
Reinstwasseranlage	RiOs Water Purification System, Millipore, Schwalbach
Schwingmühle	MM 301, Retsch, Haan
Thermoblock	Thermo Stat Plus, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg
UPLC-Anlage	Acquity™ Ultra Performance LC, Waters Micromass, Milford, USA
UPLC-Säulen	Acquity UPLC® BEH C18 Column, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm, Waters Micromass, Milford, USA Acquity UPLC® BEH C8 Column, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm, Waters Micromass, Milford, USA Acquity BEH C18 VanGuard, 2,1 x 5 mm, 1,7 µm, Waters Micromass, Milford, USA Acquity BEH C8 VanGuard, 2,1 x 5 mm, 1,7 µm, Waters Micromass, Milford, USA
Querstromsterilbank	Ceag Envirco, Dortmund

2.5 Nährmedien

***Arabidopsis*-Nährmedium** (Tocquin et al., 2003):

	mol/l
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	1.01x10 ⁻³
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.30x10 ⁻⁴
KNO ₃	5.10x10 ⁻³
MgSO ₄ x7H ₂ O	4.98x10 ⁻⁴
EDTA	2.23x10 ⁻⁵
FeSO ₄ x7H ₂ O	2.24x10 ⁻⁵
H ₃ BO ₃	9.68x10 ⁻⁶
MnCl ₂ .4H ₂ O	2.03x10 ⁻⁶
ZnSO ₄ x7H ₂ O	3.14x10 ⁻⁷
CuSO ₄ x5H ₂ O	2.10x10 ⁻⁷
MoO ₃	1.39x10 ⁻⁷
Co(NO ₃) ₂ x6H ₂ O	8.59x10 ⁻⁸
NH ₄ NO ₃	2.93x10 ⁻⁵

für Festmedium 10g/l Phyto-Agar

LB-Medium

10 g/l Trypton,
5 g/l Hefeextrakt,
10 g/l NaCl
pH 7,0
für Festmedium 15 g/l Agar

MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962)

4,8 g/l MS-Salze (inkl. MES-Puffer)
1 ml/l B5 Vitamine (100 mg/ml Myo-Inositol, 10 mg/ml Thiamine/HCl, 1 mg/ml
Nicotinsäure, 1 mg/ml Pyridoxin/HCl)
0,1 g/l Myo-Inositol
pH 5,7
für Festmedium 9 g/l Phyto-Agar

YEB-Medium

5 g/l Beefextrakt
 5 g/l Pepton
 1 g/l Hefeextrakt
 5/l g Saccharose
 0,5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O
 pH 7,2
 für Festmedium 15 g/l Agar

Alle Medien wurden vor der Verwendung für 30 min bei 121°C und 2 Bar autoklaviert.

2.6 Antibiotika

In Tabelle 2.1 sind die jeweilige Stock-Konzentration, das Lösungsmittel und der Hersteller der verwendeten Antibiotika aufgelistet. Die Antibiotika wurden in einer 1:1000 Verdünnung verwendet und aufgrund ihrer Thermosensitivität dem Medium erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

Tabelle 2.1 Stock-Konzentration, Lösungsmittel und Hersteller der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration (mg/ml)	gelöst in	Firma
Gentamycin	15	Wasser	AppliChem, Darmstadt
Kanamycin	50	Wasser	AppliChem, Darmstadt
Rifampicin	50	DMSO	Duchefa, Haarlem, NL
Spectinomycin	100	Wasser	Duchefa, Haarlem, NL

2.7 Lösungen und Puffer**Bleichlösung**

10 ml Natriumhypochlorid (13%)
 10 µl Tween20 (10%)
 5 ml Wasser (steril)

Blocking Solution

5% Magermilchpulver
 in TBS

DNA-Ladepuffer (10x)

0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylencyanol
 20 mM EDTA
 30% Glycerin

Harnstoffextraktions-Puffer

4 M Harnstoff
16,6% Glycerin
5% β -Mercaptoethanol
5% SDS
0,5% Bromphenolblau

RNA-Ladepuffer (2x)

76 μ l 5x RNA-Laufpuffer
126 μ l Formaldehyd (37%)
378 μ l Formamid
76 μ l 10x DNA-Ladepuffer
5 μ l Ethidiumbromid (1%)

RNA Lauf-Puffer (5x)

200 mM MOPS
50 mM NaAc
5 mM EDTA (pH 7,0)
35 mM NaOH
0,1% DEPC

SDS-Page Laufpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat (pH 8,6)
1 mM EDTA

TBS-Puffer

7,7 mM Tris-HCL (pH 7,4)
150 mM NaCl

TBST-Puffer

7,7 mM Tris-HCL (pH 7,4)
150 mM NaCl
0,1% Tween20

Transferpuffer

25 mM Tris-HCl (pH 8,3)
192 mM Glycin
20% Methanol
0,05% SDS

2.8 Pflanzenmaterial

Für die durchgeführten Experimente wurde als Wildtyp Pflanzenmaterial des *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 (Col-0) verwendet. Zudem wurden verschiedene Mutanten-Linien genutzt. Die *lox2* (Glauser et al., 2009), *lox3/4* und *lox6* (Caldelari et al., 2011) Mutanten wurden freundlicher Weise von E. Farmer zur Verfügung gestellt. Die *dde2* Mutante (von Malek et al., 2002) wurde freundlicher Weise von B. Keller zur Verfügung gestellt.

2.9 Bakterien

In Tabelle 2.2 sind die verwendeten Bakterienstämme und deren Eigenschaften aufgelistet. Die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien erfolgte in flüssig LB-Medium unter kontinuierlichem Schütteln oder auf LB-Agar Platten bei 37°C. Die Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) erfolgte in flüssig YEB-Medium unter kontinuierlichem Schütteln oder auf YEB-Agar Platten bei 28°C.

Tabelle 2.2 Bezeichnung und Eigenschaften der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften
<i>E. coli</i> DB3.1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B^- , m_B^-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl5 Δ leu mtl1
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ^-
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	GentR, RifR

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Pflanzenmaterial

3.1.1 Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen auf Erde

Die verwendeten Pflanzen wurden in Standard Anzuchterde in einer Klimakammer unter Kurztagesbedingungen (20°C, 9 h Licht, 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht-intensität) angezogen. Zur Samenproduktion wurden die Pflanzen nach 5 Wochen in Langtagesbedingungen (23°C, 16 h Licht, 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität) umgesetzt.

3.1.2 Oberflächen-Sterilisation von *Arabidopsis* Samen

Um die Keimung von *Arabidopsis* Samen unter sterilen Bedingungen zu ermöglichen, wurden diese in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zunächst für 2 min mit 1 ml 70% Ethanol und anschließend für 10 min mit 1 ml Bleichlösung behandelt. Zuletzt wurden die Samen fünfmal mit je 1 ml sterilen Wasser gewaschen.

3.1.3 Hydroponische Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen

Die hydroponische Pflanzenanzucht wurde nach (Tocquin et al., 2003) durchgeführt. *Arabidopsis* Samen wurden Oberflächen-sterilisiert und anschließend in sterile 0,5 ml Reaktionsgefäße, gefüllt mit *Arabidopsis*-Nährmedium (1% Phyto-Agar), gesät. Diese wurden in einer geschlossenen Kiste für 14 Tage steril bei 20°C, 9 h Licht (80 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität) in einem Klimaschrank (Percival) angezogen. Für die weitere Kultivierung wurden etwa 2 mm des Bodens der Reaktionsgefäße abgeschnitten und die Gefäße in je ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit *Arabidopsis*-Nährmedium, überführt. Um Lichteinfall an den Wurzeln der Pflanzen zu vermeiden, wurden je 11 der 50 ml Gefäße in eine lichtundurchlässige Kiste (152x104x102 mm Innenmaß) gesetzt und die 0,5 ml Reaktionsgefäße mit den Keimlingen durch ein Loch im Deckel der Kiste in die Gefäße platziert. Die Kisten wurden für weitere 4 Wochen unter denselben Bedingungen wie zuvor kultiviert. Eine Woche vor Ernte der Pflanzen wurde das *Arabidopsis*-Nährmedium nachgefüllt.

3.1.4 Verwundung

Für Verwundungsversuche wurden 6 Wochen alte, hydroponisch angezogene *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Die Pflanzen wurden mit einer Pinzette je einmal quer über jedes Blatt der Rosette und je fünfmal entlang der Wurzel durch Quetschen verwundet. Zu gegebenen Zeitpunkten wurde das Spross- und Wurzelmaterial getrennt,

indem die Pflanzen über- und unterhalb des Reaktionsgefäßes, in dem sie gesät wurden, abgeschnitten wurden. Das Hypokotyl wurde verworfen. Das Material wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.1.5 Sorbitol Behandlung

Für die Behandlung mit osmotischem Stress wurden 6 Wochen alte hydroponisch angezogene *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Das *Arabidopsis*-Nährmedium wurde durch 0,5 M Sorbitol-Lösung oder Wasser (Kontrolle) ersetzt. Die Pflanzen wurden, unter denselben Bedingungen wie zuvor, weiterkultiviert und zu gegebenen Zeitpunkten, wie unter Punkt 3.1.4 beschrieben, geerntet.

3.1.6 Trockenstress

Für Trockenstress Versuche wurden 4 Wochen alte, in Erde kultivierte *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Die Pflanzen wurden über Nacht für 16 h gewässert. Das überschüssige Wasser wurde anschließend entfernt und die Pflanzen für weitere 25 Tage ohne Gießen kultiviert. Wenn alle Pflanzen deutliche Welke-Symptome zeigten, wurden diese erneut gewässert und nach zwei Tagen die Überlebensrate ermittelt. Um den Wassergehalt der Pflanzen zu bestimmen, wurde 16, 20 und 22 Tage nach dem ersten Wässern das Frisch- und Trockengewicht von ganzen Blattrosetten ermittelt und der prozentuale Wassergehalt berechnet.

Um den Welke-Phänotyp hydroponisch kultivierter Pflanzen zu ermitteln, wurden 5 Wochen alte Pflanzen verwendet. Das *Arabidopsis*-Nährmedium wurde entfernt und das Welken der Pflanzen in einem Lichtregal bei 24°C und Dauerlicht ($45 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität) über 20 Stunden alle 5 min durch ein Foto dokumentiert. Die durchschnittliche Welke-Zeit einer Pflanze wurde zu dem Zeitpunkt ermittelt, wenn fünf Blätter deutliche Welke-Symptome zeigten.

Für analytische Untersuchungen wurden 6 Wochen alte, hydroponisch angezogene *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Das *Arabidopsis*-Nährmedium wurde entfernt und die Pflanzen mit tropfnassen Wurzeln zurück in die Kiste gehängt. Zudem wurde, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu erhalten und die Wurzeln vor dem kompletten Absterben zu bewahren, feuchter Zellstoff auf den Boden der Kiste gelegt. Die Pflanzen wurden, unter denselben Bedingungen wie zuvor, weiterkultiviert und zu gegebenen Zeitpunkten, wie unter Punkt 3.1.4 beschrieben, geerntet.

3.1.7 Pfropfen von *Arabidopsis* Pflanzen

Die Pfropfungsexperimente wurden mit 7 Tage alten *Arabidopsis* Col-0 und *dde2* Pflanzen nach (Turnbull et al., 2002) durchgeführt. Dazu wurden, wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben, oberflächensterilisierte Samen auf MS-Agar Platten mit 1,5% Saccharose ausgesät, mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Washington, USA) verschlossen und für zwei Tage im Dunkeln bei 4°C stratifiziert. Die Platten wurden anschließend aufrecht stehend in einem Lichtregal bei 24°C und Dauerlicht (40 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Lichtintensität) wachsen gelassen. Nach fünf Tagen wurden die Platten abgedeckt und so die Lichtintensität auf 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ reduziert. Nach weiteren zwei Tagen wurde die eigentliche Pfropfung durchgeführt. Dazu wurden die Keimlinge mit den Blättern auf einer Rasierklinge auf einer MS-Agar Platte mit 1,5% Zucker platziert und unter einem Binokular entlang der Kante mit einer scharfen Rasierklinge das Hypokotyl nah an den Blättern durchtrennt. Die Spross- bzw. Wurzelstücke wurden je auf MS-Agar Platten mit 0,5% Saccharose platziert und unter dem Binokular mit jeweils Spross- oder Wurzelstücken einer anderen Pflanze zusammengelegt. Anschließend wurden die Platten erneut mit Parafilm verschlossen und für weitere 7 Tage aufrecht stehend bei 24°C und Dauerlicht (25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Lichtintensität) kultiviert. Nach diesem Zeitraum wurden alle erfolgreich zusammen gewachsenen Pflanzen auf MS-Agar Platten ohne Saccharose umgesetzt. Falls Adventivwurzeln gewachsen sind, wurden diese entfernt. Die Platten wurden zu 2/3 mit Parafilm und 1/3 mit luftdurchlässigem Leukopor (BSN Medical, Hamburg) verschlossen und weitere 14 Tage aufrecht stehend in einem Klimaschrank bei 20°C unter Kurztagesbedingungen (9 h Licht, 80 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Lichtintensität) wachsen gelassen. Alle gut angewachsenen Pflanzen, ohne neue Adventivwurzeln, wurden anschließend in das hydroponische System (Kapitel 3.1.3) umgesetzt und weiter kultiviert, bis sie acht Wochen alt waren.

3.1.8 Agrobakterien vermittelte Pflanzentransformation

Für die stabile Pflanzentransformation wurde die Methode des „Floral dip“ nach (Clough and Bent, 1998) verwendet. Die transgenen Agrobakterien wurden in 200 ml YEB-Medium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, über Nacht (28°C, Schüttler) kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert (15 min, 3000 rpm, 4°C), anschließend in einer 5% Glukose-Lösung resuspendiert und eine OD_{600} von 0,8 eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde, um eine bessere Benetzung der Blüten zu erreichen, mit 0,05% Silwet[®] L-77 versetzt. Anschließend wurden blühende, in Erde angezogene, *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen mit den Blütenständen für 15-20 s in die vorbereitete Bakteriensuspension getaucht, in Frischhaltefolie gewickelt und für 24 h in einem abgedunkelten Raum inkubiert. Den Pflanzen wurden vor der Behandlung alle bereits

entwickelten Schoten entfernt, um die Anzahl nicht transformierter Samen zu verringern. Nach Entfernen der Frischhaltefolie wurden die Pflanzen bis zur Samenreife weiter kultiviert (siehe Kapitel 3.1.1).

3.1.9 Selektion transgener *Arabidopsis* Pflanzen

Die Selektion transgener *Arabidopsis* Pflanzen erfolgte auf MS-Agar Platten (3% Saccharose) mit 50 µl/l Basta® (Bayer, Leverkusen). Etwa 100 Oberflächen-sterilisierte Samen (Kapitel 3.1.2) wurden auf je eine Agarplatte verteilt, diese mit Parafilm verschlossen und für 7 Tage in einem Lichtregal bei 24°C und Dauerlicht (80 µmol Photonen m⁻²·s⁻¹) kultiviert. Alle deutlich gekeimten Samen wurden anschließend auf MS-Agar Platten mit 3% Saccharose ohne Basta® umgesetzt, mit Parafilm verschlossen und weitere 14 Tage in einem Klimaschrank unter Kurztagesbedingungen (20°C, 9 h Licht, 80 µmol Photonen m⁻²·s⁻¹) wachsen gelassen. Alle angewachsenen Pflanzen wurden anschließend zur Samenbildung in Erde (Kapitel 3.1.1) oder zur Verwendung für Versuche in das hydroponische System (Kapitel 3.1.3) umgesetzt und unter den entsprechenden Bedingungen weiter kultiviert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Um bestimmte DNA Abschnitte zu vervielfältigen, oder bestimmte funktionelle Sequenzabschnitte an DNA Abschnitte anzuhängen, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Die Reaktionen wurden mit einer *Taq*-DNA-Polymerase (*Thermus aquaticus*) durchgeführt. Um Produkte für Klonierungen zu erhalten wurde zusätzlich eine *Pfu*-DNA-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*) im Verhältnis 1:5 (v/v) verwendet. Als Template dienten sowohl Plasmid-DNA als auch cDNA.

PCR-Reaktionsansatz:

Taq-Puffer (10x)	2,0 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth)	0,4 µl
dNTPs (2,5 mM)	1,6 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
Primer1 (10 µM)	0,4 µl
Primer2 (10 µM)	0,4 µl
Template	10-100 ng
Wasser	ad 20 µl

Das verwendete PCR-Thermoprotokoll ist in Tabelle 3.1 und die Bezeichnungen und Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.1 Verwendetes PCR-Thermoprotokoll

	Zeit	Temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	3 min	94	1
Denaturierung	30 s	94	35
Primerbindung	30 s	50-62	
Elongation	20-160 s	72	
Finale Elongation	10 s	72	1
Kühlung	∞	4	1

Tabelle 3.2 Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Primer für die PCR. Die attB1 bzw. B2 sites sind unterstrichen dargestellt.

Bezeichnung	Primersequenz (5` → 3`)
attB1 LOX2	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> ATATGTATTGTAGAGAGTCCTTG
attB2 LOX2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAATAGAAATACTATAAGGAAC
attB1 LOX6	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> ATATGTTTCGTAGCATCTCCGGTA
attB2 LOX6	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAAATGGAAATGCTGTTGGGAATA

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um die in der PCR erhaltenen DNA Fragmente aufzutrennen und ihre Größe zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Fragment-Größe wurde ein 1-1,2%iges Gel mit TAE-Puffer hergestellt und mit 0,02 µl/ml Ethidiumbromid-Lösung (1%) versetzt. Die DNA Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer vermischt, in die dafür vorgesehenen Taschen des Agarose-Gels pipettiert und für etwa 20-30 min bei einer Spannung von 120 V in einer Kammer mit TAE-Puffer aufgetrennt. Die Detektion der DNA Banden erfolgte unter UV-Licht bei 364 nm. Um die Größe der DNA-Fragmente genau bestimmen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben ein spezifischer Größenmarker verwendet.

3.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um das erhaltene PCR-Produkt aufzureinigen wurde entweder der PCR Ansatz direkt verwendet oder die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht aus einem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte jeweils mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey und Nagel, Düren) nach dem entsprechenden Protokoll. Abweichend vom Protokoll wurde für die Elution der DNA, statt des beigelegten Puffers, Wasser verwendet.

3.2.4 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde das Pure Extreme: GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Roth) nach dem zugehörigen Protokoll verwendet. Abweichend vom Protokoll wurde für die Elution der Plasmid-DNA statt des beigelegten Puffers Wasser verwendet.

3.2.5 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren beruht auf der Extinktion der Stickstoff-Basen. Eine Probe mit einer DNA Konzentration von 50 ng/μl oder RNA Konzentration von 40 ng/μl zeigt bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm eine Optische Dichte (OD) von 1,0. Somit kann die DNA/RNA Konzentration wie folgt bestimmt werden:

$$\text{Konzentration } \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] = E_{260} \times 50(\text{DNA}) \text{ bzw. } 40(\text{RNA}) \times \text{Verdünnung}$$

Die Konzentration der isolierten Nukleinsäure wurde mittels eines NANODROP 1000 Spectrophotometers bestimmt. Zunächst wurde, zur Kalibrierung des Geräts, 1,5 μl des Lösemittels der Nukleinsäure (meist Wasser) auf den Sensor aufgetragen. Anschließend wurde, durch Aufbringen von je 1,5 μl der Proben und photometrische Messung der Extinktion bei $\lambda = 260$ nm, der Gehalt an DNA oder RNA in ng/μl durch die Software des Geräts ermittelt.

3.2.6 Gateway™- Klonierung

Zur Klonierung von DNA Sequenzen wurde der BP-Clonase™ II Enzyme Mix und der LR-Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Die Klonierung erfolgte nach dem zugehörigen Protokoll für die BP- und LR-Reaktion. Abweichend vom Protokoll wurde nur ein halber Ansatz je Reaktion verwendet. Zur Erzeugung von *LOX2* bzw. *LOX6* Überexpressionslinien wurden für die BP-Reaktion 45 ng des entsprechenden PCR Produkts (*LOX2* bzw. *LOX6* cDNA Sequenz mit den entsprechenden attB1 und B2 sites (siehe Tabelle 3.2)) und 75 ng des *donor vectors* pDONR201 verwendet und so ein *entry clone* generiert. Anschließend erfolgte eine LR-Reaktion mit 100 ng des zuvor generierten *entry clones* und 150 ng des *destination vectors* pB2GW7-HA. Dadurch wurde ein *expression clone* generiert, welcher für die stabile Pflanzentransformation geeignet ist. Die Eigenschaften der verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Die Vektorkarten der erhaltenen *expression clones* sind im Anhang unter Abbildung A.8 und Abbildung A.9 dargestellt.

Tabelle 3.3 Für die Gateway™-Klonierung verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pDONR™201	<i>donor vector</i> zum Erstellen eines <i>entry clones</i> , pUC ori, KmR, attL1, CmR, ccdB, attL2	Invitrogen, 2001
pB2GW7-HA	<i>destination vector</i> zum Erstellen von stabilen Überexpressionspflanzen, SpR, LB, BaR, p35S, 3xHA-tag, attR1, attR2, T35S, RB	(Koster et al., 2012)

3.2.7 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von *E. coli* wurde ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit dem entsprechenden Reaktionsansatz der Gateway™-Klonierung (Kapitel 3.2.6) versetzt. Die Zellen wurden anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 70 s und erneuter Abkühlung, 70 s auf Eis, wurde dem Reaktionsansatz 500 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 1 Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln (350 rpm) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien zur Selektion auf LB-Agar Platten mit den erforderlichen Antibiotika (Tabelle 2.1) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Transformation von *A. tumefaciens* wurde ein 60 µl Aliquot chemisch kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Kälteschock für 5 min in flüssigem Stickstoff und Auftauen des Reaktionsansatzes für 10 min bei 37°C wurde dem Reaktionsansatz 500 µl YEB-Medium zugegeben und die Bakterien für 3 Stunden bei 28°C unter leichtem Schütteln (300 rpm) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien zur Selektion auf YEB-Agar Platten mit den erforderlichen Antibiotika (Tabelle 2.1) ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert.

3.2.8 Kolonie PCR-Screen

Um den Erfolg der Bakterientransformation zu bestätigen, wurde ein Kolonie PCR-Screen durchgeführt. Für *E. coli* wurden dazu die nach der Transformation gewachsenen Kolonien in 25 µl Wasser gelöst und davon 10 µl als Template für eine PCR (Kapitel 3.2.1) verwendet.

Für *A. tumefaciens* wurde von den nach der Transformation gewachsenen Kolonien eine 3 ml YEB-Medium Übernachtskultur hergestellt, die Zellen pelletiert (2 min, 10000 rpm) und der Überstand verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in 150 µl Wasser gelöst, für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend zentrifugiert (15 min, 10000 rpm). Vom erhaltenen Überstand wurden 10 µl als Template für eine PCR (Kapitel 3.2.1)

verwendet. Anschließend wurde von dem PCR-Produkt eine Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.2) durchgeführt, um die positiven Kolonien zu identifizieren.

3.2.9 Herstellung von Glycerin-Stocks

Um die positiven Bakterienkolonien dauerhaft lagern zu können, wurden Glycerin-Stocks angelegt. Von einer frischen Übernachtskultur der Bakterien wurden 500 µl in ein mit 100 µl sterilem Glycerin gefülltes 2 ml Schraubdeckelgefäß gegeben und vorsichtig durchmischt. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 gelagert.

3.2.10 Sequenzierung von DNA-Abschnitten

Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten wurde von der Firma LCG-Genomics (Berlin) durchgeführt. Dazu wurde pro Sequenzierung 1 µg DNA in 10 µl Wasser und 4 µl eines entsprechenden Primers (5 pmol/µl) eingeschickt. Die Bezeichnungen und Sequenzen der verwendeten Sequenzier-Primer sind Tabelle 3.4 in dargestellt.

Tabelle 3.4 Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Sequenzier-Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5` → 3`)
LOX2Seq1	GTTCTTGCCTTGTAAGGTCT
LOX2Seq2	CATGATAATCCAACACGAACA
LOX2Seq3	GTTACGAGACGACGAGTTTG
LOX2Seq4	TGAAGAACTGATCACATCGG
LOX6Seq1	TTTAATCCCATCCGGAGTCT
LOX6Seq2	TCTCTACAAATGGCAAGAG
LOX6Seq3	CCCTGTGAACATTGAGCTAC
LOX6Seq4	AGACGGTCTTTTGATCTGGA

3.2.11 Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Um RNA aus *Arabidopsis* Blatt- und Wurzelmaterial zu isolieren, wurde die peqGOLD TriFast™ Lösung (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) verwendet. Es wurden etwa 100 mg in flüssigem Stickstoff gefrorenes, gut gemörsertes, Pflanzenmaterial eingesetzt und nach dem zugehörigen Protokoll aufgearbeitet. Die RNA wurde in 20-60 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser gelöst.

3.2.12 Untersuchung der RNA Integrität

Um eine Degradierung der RNA ausschließen zu können, wurde eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung eines 1,2%igen Gels wurden 1,2 g Agarose in 62,5 ml Wasser für 2 min bei 800 W in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurden der Lösung 20 ml 5x RNA-Laufpuffer und 17,5 ml Formaldehyd-Lösung (37%) zugegeben, alles gut durchmischt, in einen vorbereiteten Schlitten gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Je ein Aliquot von 3 µl der zu untersuchenden RNA Proben wurden mit 2 µl Wasser und 5 µl 2x RNA-Ladepuffer versetzt, 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abkühlen gelassen. Die RNA Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert und für eine Stunde eine Spannung von 90 V angelegt. Durch das im RNA-Ladepuffer enthaltene Ethidiumbromid konnten die aufgetrennten rRNA Banden im Gel unter UV Licht, bei 364 nm, sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

3.2.13 DNase-Verdau, Fällung der RNA und cDNA Synthese

Um restliche, störende, genomische DNA zu entfernen, wurde ein Verdau mit einem DNase-I Enzym durchgeführt. Um die RNA anschließend in reinem Zustand, ohne die zum Verdau benötigten Komponenten, vorliegen zu haben, wurde diese ausgefällt und erneut in DEPC behandeltem Wasser gelöst. Dazu wurde zunächst 1 µg Gesamt-RNA, in einem Volumen von 8 µl DEPC behandeltem Wasser, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 µl 10x DNase-Puffer und 1 µl DNase-I Enzym (1 u/µl, Fermentas, St. Leon-Roth) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase-Reaktion wurde anschließend 1 µl EDTA (25 mM) zugegeben und der Ansatz für 10 min auf 65°C erhitzt. Der abgestoppte DNase-Verdau wurde mit 9 µl DEPC behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Zur Fällung der RNA wurden 1 µl Glycogen (20 mg/ml), 2,1 µl Ammoniumacetat (5 M) und 23,1 µl Isopropanol zugegeben und der Ansatz über Nacht (mindestens jedoch zwei Stunden) bei -20°C gekühlt. Die ausgefällte RNA wurde für 15 min bei 14000 rpm, 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das erhaltene Pellet mit 500 µl Ethanol (75%) durch kurzes Durchmischen und erneutes Zentrifugieren für 8 min bei 14000 rpm, 4°C gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen, das erhaltene Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend auf Eis in 7 µl DEPC behandeltem Wasser gelöst. In einem PCR-Gefäß wurden 2 µl 5x RT-Puffer mit 0,5 µl dNTPs (10 mM) und 0,4 µl Poly-T-Primer (100 mM, T27, TIB Molbiol, Berlin), zusammengegeben. Dem Ansatz wurden anschließend 6,7 µl der zuvor gelösten RNA zugefügt und alles für 5 min auf 70°C erhitzt. Die Proben wurden nachfolgend auf Eis abgekühlt, 0,4 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 u/µl, Promega, Mannheim) zugegeben und 1 Stunde bei 42°C

inkubiert. Zur Denaturierung der reversen Transkriptase erfolgte anschließend eine 15 minütige Erwärmung auf 70°C. Die erhaltene cDNA wurde mit HPLC Wasser 1:20 (w/v) verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.14 Quantitative PCR

Zur Quantifizierung bestimmter Genprodukte wurden 2 µl der verdünnten cDNA (Kapitel 3.2.13) in einer 96-well PCR-Platte mit 10 µl Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix (Thermo Fischer Scientific, Hamburg) und je 4 µl der entsprechenden *forward* und *reverse* Primer (1,5 µM) versetzt. Neben der cDNA der zu untersuchenden Proben wurden als Negativkontrolle 2 µl HPLC Wasser verwendet. Als Standardreihe dienten 20, 2, 0,2 und 0,02 fg des jeweiligen PCR-Produkts in 2 µl HPLC Wasser. Als Bezugs-Gen für die Quantifizierung wurde SAND (At2G28390) verwendet. Alle Bezeichnungen, Atg-Nummern, Sequenzen und Amplifikatlängen der verwendeten Primer finden sich in Tabelle 3.5. Die qRT-PCR wurde in einem CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, München) nach dem in Tabelle 3.6 angegebenen Thermoprotokoll durchgeführt.

Tabelle 3.5 Bezeichnung, Atg-Nummer, Sequenz und Amplifikatlänge der verwendeten Primer

Gen	Primersequenz forward (5' → 3')	Primersequenz reverse (5' → 3')	Amplifikat (bp)
SAND At2G28390	AACTCTATGCAGCATT	GGTGGTACTAGCACAA	219
LOX2 At3g45140	GCCATTGAGTTGACTTGTC	CACTTAGTTGTCTATTTGCCGC	248
LOX3 At1g17420	TCCCTGCCGATCTAA	GTTTGGGACGTAGCCA	377
LOX4 At1g72520	GCTTGCTTAGATACGACACT	ATGTGGTCTCCGTGAGAGC	199
LOX6 At1g67560	AAGACTGTTACTGCGGTTG	GGCTGTGAATACGAGGTATC	231

Tabelle 3.6 Verwendetes Thermoprotokoll für die qPCR

	Zeit	Temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	15 min	95	1
Denaturierung	15 s	95	45
Primerbindung	20 s	58	
Elongation	20 s	72	
Messung	3 s	79	
Finale Denaturierung	10 s	95	1
Schmelzkurve	65-95 (0,5er Schritte)		

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Zunächst wurden etwa 100 mg in flüssigem Stickstoff gefrorenes, gut gemörsertes, Pflanzenmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Harnstoffextraktions-Puffer versetzt, gut durchmischt und anschließend 10 min bei 75°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben für 15 min bei 14000 rpm, RT zentrifugiert und der Überstand auf Eis in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Der erhaltene Proteinextrakt wurde, bis zur Verwendung für die diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (Kapitel 3.3.2), bei -80°C gelagert.

3.3.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinextrakten wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Lämmli (Lämmli, 1970) durchgeführt. Dazu wurde zunächst das nach Tabelle 3.7 hergestellte Trenngel zwischen zwei, in einem Gelgießrahmen vertikal ausgerichtete, abgedichtete Glasplatten gegossen. Das Trenngel wurde, um einen geraden Abschluss zu erreichen, sofort nach dem Gießen mit 400 µl Isopropanol überschichtet und ca. 20 min auspolymerisieren gelassen. Die Isopropanol-Phase wurde abgenommen, der Zwischenraum über dem bereits festen Trenngel mit Wasser gewaschen und vorsichtig alle Flüssigkeit mit saugfähigem Papier entfernt.

Tabelle 3.7 Pipettierschema für je 2 Trenn- und Sammelgele, Angaben in ml

	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
Acrylamid-Mix (30%)	4	1,7
Tris-HCl (1 M, pH 8,8)	4,2	-
Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	-	2,5
Wasser	1,65	5,85
SDS (10%)	0,1	0,1
TEMED	0,04	0,01
APS (10%)	0,05	0,04

Anschließend wurde das nach Tabelle 3.7 hergestellte Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurde der Rahmen in eine Elektrophoresekammer überführt und das fertige Gel mit SDS-Page Laufpuffer überschichtet. Der Probenkamm wurde entfernt und die Taschen mit demselben Puffer gut durchgespült. Von den nach Kapitel 3.3.1 hergestellten Proteinextrakten wurden je 40 µl für 10 min auf 65°C erhitzt, auf Eis gekühlt und in die

Taschen des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung wurden zusätzlich 5 µl PageRuler® Proteinmarker (Fermentas, St Loen-Roth) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst 10 min bei einer Spannung von 100 V, anschließend für eine Stunde bei 200 V.

3.3.3 Elektrophoretischer Proteintransfer (Nass-Blot Verfahren)

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst für einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert. In dieser Zeit wurden die benötigte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran und zwei Filterpapiere auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere und vier benötigte Schwammpads wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde, zur Aktivierung, einige Sekunden in Methanol getaucht, anschließend mit Wasser gewaschen und ebenfalls mit Transferpuffer äquilibriert. Für den Proteintransfer wurden nun die verschiedenen Bestandteile, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, luftblasenfrei in einen Blot-Einsatz geschichtet. Der Blot-Einsatz wurde anschließend in einer Blot-Kammer eingeklemmt, mit Transferpuffer überschichtet und die restliche Kammer zur Kühlung mit Wasser gefüllt. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei einer Spannung von 30 V.

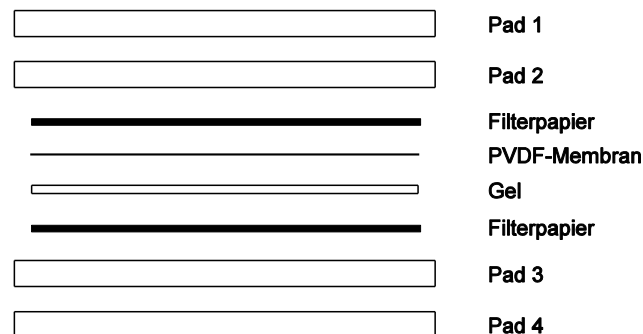


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau eines Nassblots

3.3.4 Immunodetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran in TBS gewaschen und in Blocking Solution für 20 min (max. eine Stunde) bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Membran mit einer 1:500 Verdünnung eines polyklonalen HA-Primärantikörpers (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) in TBST-Puffer mit 5% Milchpulver über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBST-Puffer gewaschen und eine Stunde mit einer 1:7500 Verdünnung eines HRP (Meerrettich Peroxidase) gekoppelten *Goat Anti-Rabbit* Sekundärantikörpers (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in TBST-Puffer mit 5% Milchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal je 5 min mit TBS-Puffer

gewaschen und mit vorbereitetem Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Schwalbach) bedeckt. Die Lösung wurde nach 2 min mit saugfähigem Papier wieder entfernt. Die Meerrettich Peroxidase (HRP) katalysiert die oxidative Umsetzung von im Detektions-Reagenz enthaltenen Luminolderivaten, wodurch Chemolumineszenz entsteht. In einer Dunkelkammer wurde, zur Detektion der Chemolumineszenz, ein medizinischer Röntgenfilm Film (Fujifilm, Düsseldorf) auf die Membran aufgelegt. Der Film wurde anschließend etwa drei Minuten in ein Entwicklerbad gegeben, kurz mit Wasser gewaschen, etwa zwei Minuten fixiert, erneut gewaschen und trocken gelassen.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Extraktion und Analyse von Hydroxyfettsäuren

Zur Analyse von Hydroxyfettsäuren wurde frisches, schockgefrorenes Blatt- und Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend gefriergetrocknet. Je 25 mg des getrockneten Spross- und 18 mg des Wurzelmaterials wurden in ein 2ml Schraubdeckel Reaktionsgefäß eingewogen und mit 800 µl Isopropanol, versetzt mit 0,5 mg Triphenylphosphan und 0,75 mg Butylhydroxytoluol, extrahiert. Nach 20 min Reduktionszeit wurde 150 ng 15-HEDE als interner Standard zugefügt. Die Proben wurden für 5 min in einem Ultraschallbad behandelt, anschließend zentrifugiert (21°C, 14000 rpm, 10 min) und der erhaltene Überstand in ein Reagenzglas überführt. Das zurückgebliebene Pellet wurde erneut, wie zuvor beschrieben, mit 1,5 ml Chloroform/Isopropanol (1:2, v/v) und 1,5 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) extrahiert und zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden mit den vorherigen vereinigt und im Wasserbad bei 60°C zur Trockene eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wurde in 40 µl 1 mM wässrigem Ammoniumacetat/Acetonitril (1:2, v/v) gelöst, zentrifugiert (21°C, 14000 rpm, 10 min) und zur weiteren Analyse in UPLC-Probengefäße überführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels UPLC-Tandem MS. Die Auftrennung erfolgte über eine Aquity UPLC BEH C18 Säule (2.1 x 50 mm, 1.7 µm Partikelgröße mit einer BEH C18 Vorsäule mit Vorfilter, Waters, Milford, MA, USA), mit folgendem Lösemittelsystem: Lösemittel A=1 mM wässriges Ammoniumacetat, Lösemittel B=Acetonitril. Die Gradienten-Elution wurde mit einer Flussrate von 0,25 ml/min bei 40°C mit 65% Lösemittel A gefolgt von 30% Lösemittel A innerhalb von 6 min durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch ein Waters Micromass Quattro Premier Massen-Spektrometer (Tandem-MS), wobei die Ionen durch negative Elektrospray-Ionisation (ESI-) erzeugt wurden. Die Tandem-MS Parameter sind in Tabelle 3.8 angegeben.

Tabelle 3.8 Tandem-MS Parameter zur Detektion von Hydroxyfettsäuren

Ionisationsmodus	ESI-
Kapillarspannung (kV)	3
Quellentemperatur (°C)	120
Desolvatisierungsgasfluss (l/h) N ₂	800
Konusgasfluss (l/h) N ₂	50
Desolvatisierungstemperatur (°C)	350
Kollisionsgasdruck (bar) Ar	3.10 × 10 ⁻³

Als Detektionsmethode wurde die selektive *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) Methode verwendet. Bei dieser Methode wird im ersten Quadrupol des Tandem-MS ein Precursor-Ion anhand seines Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) herausgefiltert, im zweiten Quadrupol durch Argon als Kollisionsgas fragmentiert und im dritten Quadrupol nur ein, oder wenige, festgelegte Produkt-Ionen selektiert. In Tabelle 3.9 sind die Masse/Ladungs-Verhältnisse der Precursor-Ionen und ihrer Produkt-Ionen, sowie deren Detektionsparameter, aufgeführt.

Tabelle 3.9 Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) und Detektionsparameter der Precursor-Ionen und ihrer Produkt-Ionen von Hydroxyfettsäuren

Analyt	Precursor-Ion (m/z)	Produkt-Ion (m/z)	Konusspannung (V)	Kollisionsenergie (V)
9-HOTE	293,1	171	26	20
10-HOTE	293,1	155	26	20
12-HOTE	293,1	211	26	20
13-HOTE	293,1	195	26	20
15-HOTE	293,1	223	26	20
16-HOTE	293,1	235	26	20
15-HEDE	323,1	223	26	20

3.4.2 Extraktion und Analyse von Galaktolipiden

Zur Analyse von Galaktolipiden wurden etwa 250 mg in flüssigem Stickstoff gemörseretes und gefriergetrocknetes Blatt- und Wurzelmaterial in ein 2 ml Schraubdeckel Reaktionsgefäß eingewogen. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mit 1,5 ml auf 75°C vorgewärmten Isopropanol versetzt, kurz durchmischt und 15 Minuten, zur Denaturierung von Lipasen, bei 75°C inkubiert. Als interne Standards wurden, nach der Inkubationszeit, je 3 µg MGDG-18:0-18-0 und DGDG-18:0-18-0 zugefügt und die Proben für 5 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 21°C, 14000 rpm wurde der Überstand der Probe in ein Reagenzglas

überführt und das zurückgebliebene Pellet in 1,5 ml Chloroform/Isopropanol (1:2 v/v) durch 5 min Inkubation im Ultraschallbad gelöst. Das Reaktionsgefäß wurde erneut 10 min bei 21°C, 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit dem Ersten im Reagenzglas vereinigt. Das Pellet wurde nachfolgend für 5 Minuten im Ultraschallbad in Methanol/Chloroform (1:2 v/v) gelöst und ebenfalls 10 Minuten bei 21°C, 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit den Vorherigen vereinigt und bei 60°C im Wasserbad zur Trockene eingengt. Der trockene Rückstand wurde in 100 µl 1 mM methanolischem Ammoniumacetat gelöst, 10 Minuten bei 21°C, 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand zu Messung in UPLC-Probengefäße überführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels UPLC-Tandem MS. Die Auftrennung erfolgte über eine Aquity UPLC BEH C8 Säule (2.1 x 50 mm, 1.7 µm Partikelgröße mit einer BEH C8 Vorsäule mit Vorfilter, Waters, Milford, MA, USA), mit folgendem Lösemittelsystem: Lösemittel A=1 mM wässriges Ammoniumacetat, Lösemittel B=1 mM methanolisches Ammoniumacetat. Die Gradienten-Elution wurde mit einer Flussrate von 0,3 ml/min bei 30°C mit 25% Lösemittel A gefolgt von 100% Lösemittel B innerhalb von 10 min durchgeführt. Die Detektion der Galaktolipide erfolgte durch ein Waters Micromass Quattro Premier Massen-Spektrometer (Tandem-MS), wobei die Ionen durch ESI-erzeugt wurden. Die Tandem-MS Parameter sind in Tabelle 3.10 angegeben. Als Detektionsmethode wurde die selektive MRM Methode verwendet. In Tabelle 3.11 sind die Masse/Ladungs-Verhältnisse der Precursor-Ionen und ihrer Produkt-Ionen, sowie deren Detektionsparameter, aufgeführt.

Tabelle 3.10 Tandem-MS Parameter zur Detektion von Galaktolipiden

Ionisationsmodus	ESI-
Kapillarspannung (kV)	3,11
Quellentemperatur (°C)	120
Desolvatisierungsgasfluss (l/h) N₂	847
Konusgasfluss (l/h) - N₂	47
Desolvatisierungstemperatur (°C)	450
Kollisionsgasfluss (l/min) Ar	0,3

Tabelle 3.11 Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) und Detektionsparameter der Precursor-Ionen und ihrer Produkt-Ionen von Galaktolipiden (MGDG, DGDG und Arabidopside)

Analyt	Precursor-Ion (m/z)	Produkt-Ion (m/z)	Konusspannung (V)	Kollisionsenergie (V)
MGDG-18:0-18:0	785,6	283,3	40	26
MGDG-18:3-16:3	745,5	277,2 249,2	40	26
MGDG-18:3-18:3	773,5	277,2	40	26
DGDG-18:0-18:0	947,7	283,3	40	26
DGDG-18:3-16:3	907,5	277,2 249,2	40	26
DGDG-18:3-18:3	935,6	277,2	40	26
Arabidopsid A	773,5	263,2 291,2	40	26
Arabidopsid B	801,5	291,2	40	26
Arabidopsid C	935,5	263,2 291,2	40	26
Arabidopsid D	963,5	291,2	40	26
Arabidopsid E	1047,5	291,2	40	26
Arabidopsid G	1075,5	291,2	40	26

3.4.3 Extraktion und Analyse von Phytohormonen

Zur Analyse von Phytohormonen wurde frisches, schockgefrorenes Blatt und Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend gefriergetrocknet. Je 25 mg des getrockneten Spross- und 18 mg des Wurzelmaterials wurden eingewogen und die Proben mit 950 µl Ethylacetat/Ameisensäure (99:1, v/v) extrahiert. Als interne Standards wurden je 50 ng Dihydro-JA, (dhJA), JA-Norvalin (JA-Nva), [¹⁸O₂] OPDA und D6-ABA zugegeben. Die Proben wurden mit einer Porzellankugel versetzt und anschließend in einer Schwingmühle für 3 min bei 20 Hz homogenisiert. Nach Zentrifugation (21°C, 12000 RPM, 10 min) wurde der erhaltene Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das zurückgebliebene Pellet wurde, wie zuvor beschrieben, ein zweites Mal extrahiert und der Überstand mit dem vorherigen vereinigt. Die gesammelten Überstände wurden in einem Rotationsvakuumkonzentrator bei 40°C zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 40 µl Acetonitril/Wasser (1:1, v/v) gelöst, zentrifugiert (21°C, 14000 RPM, 10 min) und zur weiteren Analyse in UPLC-Probengefäße überführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels UPLC-Tandem MS. Die Auftrennung erfolgte über eine Aquity UPLC BEH C18 Säule (2.1 x 50 mm, 1.7 µm Partikelgröße mit einer BEH C18 Vorsäule mit Vorfilter, Waters, Milford, MA, USA), mit folgendem Lösemittelsystem: Lösemittel A=0,1% wässrige Ameisensäure, Lösemittel B=Acetonitril. Die Gradienten-Elution wurde mit einer Flussrate von 0,25 ml/min bei 40°C mit 97% Lösemittel A gefolgt von 100% Lösemittel B innerhalb von 7 min

durchgeführt. Die Detektion der Phytohormone erfolgte durch ein Waters Micromass Quattro Premier Massen-Spektrometer (Tandem-MS), wobei die Ionen durch ESI-erzeugt wurden. Die Tandem-MS Parameter sind in Tabelle 3.12 angegeben. Als Detektionsmethode wurde die selektive MRM Methode verwendet. In Tabelle 3.13 sind die Masse/Ladungs-Verhältnisse der Precursor-Ionen und ihrer Produkt-Ionen, sowie deren Detektionsparameter, aufgeführt.

Tabelle 3.12 Tandem-MS Parameter zur Detektion von Phytohormonen

Ionisationsmodus	ESI-
Kapillarspannung (kV)	3
Quellentemperatur (°C)	120
Desolvatisierungsgasfluss (l/h) N ₂	800
Konusgasfluss (l/h) N ₂	50
Desolvatisierungstemperatur (°C)	400
Kollisionsgasdruck (bar) Ar	3.10×10^{-3}

Tabelle 3.13 Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) und Detektionsparameter der Precursor-Ionen und ihrer Produkt-Ionen von JA, dhJA, OPDA, [¹⁸O]₂-OPDA, JA-Nva, JA-Ile, [D₆]-ABA und ABA

Analyt	Precursor-Ion (m/z)	Produkt-Ion (m/z)	Konusspannung (V)	Kollisionsenergie (V)
JA	209,1	59	19	17
dhJA	211,1	59	19	17
OPDA	291,1	165	22	26
[¹⁸ O] ₂ -OPDA	295,1	165	22	26
JA-Nva	308,1	116	24	18
JA-Ile	322,1	130	24	18
[D ₆]-ABA	269,1	159	26	14
ABA	263,1	153	26	14

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung von Unterschieden zwischen Wildtyp und verschiedenen Mutanten Pflanzen erfolgte mittels der SPSS Statistik Software (IBM, Ehningen). Abhängig vom Experiment wurden Varianzanalysen (ANOVA) mit darauf folgendem *least significant difference* (LSD)-Test (Abbildung 4.10, 4.12, 4.15) oder Student t-Tests unabhängiger Stichproben (Abbildung 4.18, 4.20, 4.26) durchgeführt. Die Signifikanzniveaus werden mit * p<0,05 oder ** p<0,01 angegeben.

4 Ergebnisse

Es ist bekannt, dass es in Pflanzen hinsichtlich der Expression verschiedener Biosynthese-Gene von Oxylipinen starke Unterschiede zwischen Spross- und Wurzelgewebe gibt. So werden z.B. einige der JA Biosynthese-Gene wie die AOS oder *13-LOX* Gene stärker im Spross exprimiert, wohingegen *9-LOX* Gene mehr in der Wurzel exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob diese Unterschiede ebenfalls in den Gehalten unterschiedlicher Oxylipine, wie HOTES, oxidierte Galaktolipide (Arabidopside) oder Jasmonate, der verschiedenen Pflanzenorgane wiedergespiegelt werden.

4.1 Untersuchung der Bildung von Oxylipinen in Spross und Wurzel von *Arabidopsis*

4.1.1 Lipid- und Oxylipinprofile von Wildtyp Blättern und Wurzeln

Um die Bildung von Oxylipinen in Spross und Wurzel untersuchen zu können, wurden zunächst Verwundungsversuche mit hydroponisch angezogenen *Arabidopsis* Pflanzen durchgeführt. Dies ermöglichte ein einfaches Behandeln der Pflanzen und Ernten der Wurzeln. Zudem war das System so angelegt, dass sich die Wurzeln der Pflanzen im Dunkeln befanden, um einen möglichen Einfluss von Licht auf die Oxylipinspiegel der Wurzeln zu vermeiden. Da Verwundung bereits im Spross von *Arabidopsis* Pflanzen ein etablierter Stress ist um die Bildung von Oxylipinen, insbesondere Jasmonaten, zu triggern, wurde zunächst eine Kinetik mit verwundeten Blättern und Wurzeln durchgeführt, um den Zeitpunkt mit den deutlichsten Effekten zu ermitteln. Da kein Austausch oder Transport von Oxylipinen oder deren Prekursoren stattfinden sollte, wurden Spross und Wurzel vor dem Verwunden getrennt. Das Hypokotyl wurde entfernt und nicht in die Analysen mit einbezogen. Von der Vielzahl der Oxylipine in Pflanzen wurde sich für die ersten Experimente auf die Analyse der Jasmonate OPDA, JA und JA-Ile festgelegt.

Wie in Abbildung 4.1 gezeigt, gibt es in Wurzel und Spross deutliche Effekte auf die Jasmonatspiegel nach Verwundung. Übereinstimmend mit bereits bekannten Daten gibt es im Spross deutliche Anstiege bei allen drei untersuchten Jasmonaten. OPDA steigt 0,5 Stunden nach Verwundung von $1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ auf $8,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ an und bleibt bei 2 und 24 Stunden hoch. JA und JA-Ile zeigen den stärksten Anstieg nach 0,5 Stunden (vom Detektionslimit auf 11 bzw. $2,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$), sinken nach 24 Stunden jedoch wieder stark ab. Für verwundete Wurzeln zeigen sich bei JA und JA-Ile ähnliche Kinetiken wie beim Spross mit dem stärksten Anstieg 0,5 Stunden nach Verwundung

(vom Detektionslimit auf 5 bzw. 1,7 nmol g⁻¹ TG). OPDA hingegen zeigt keinen Anstieg sondern nimmt mit fortschreitender Zeit von basal 0,8 nmol g⁻¹ TG bis zum Detektionslimit ab.

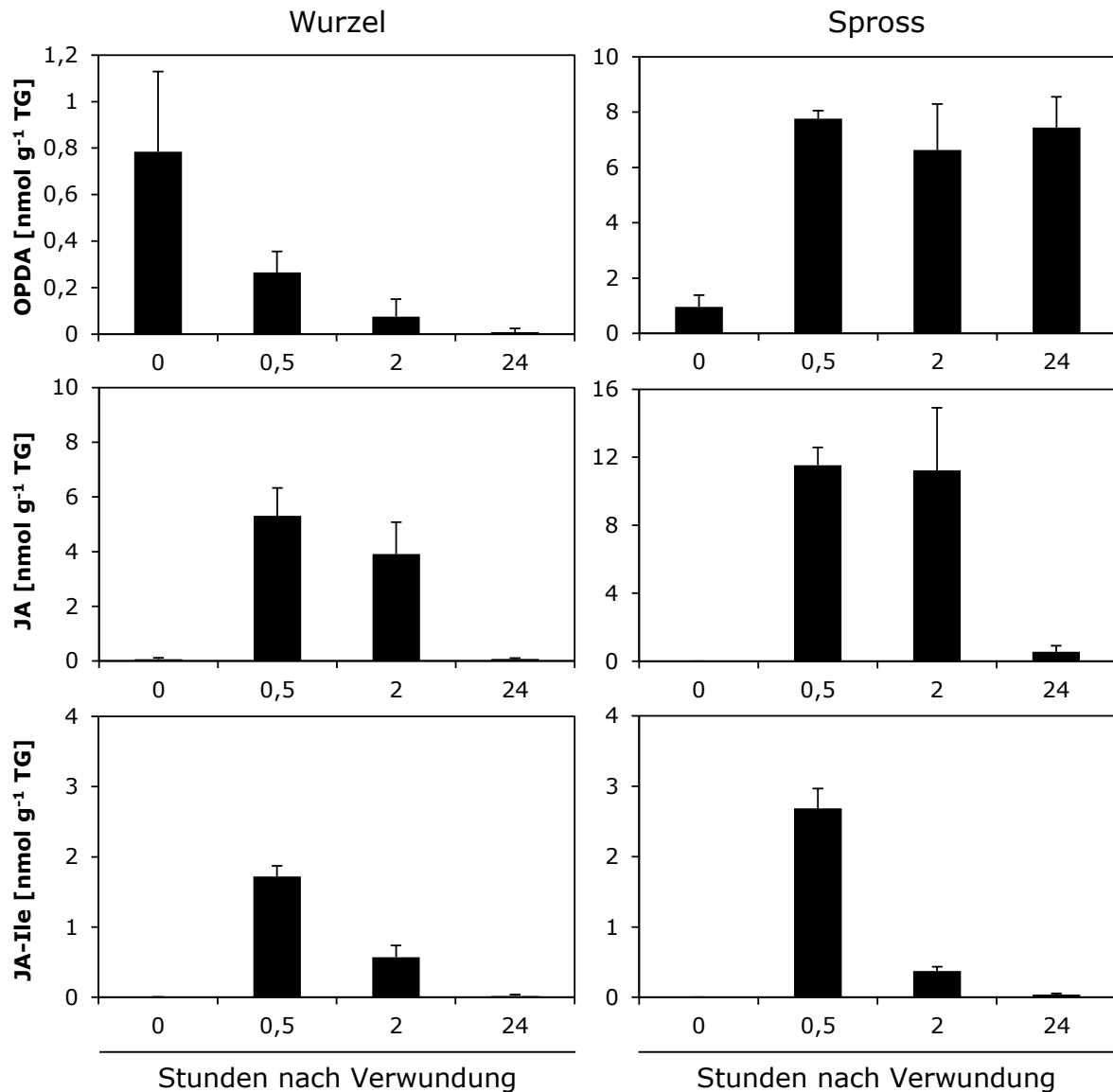


Abbildung 4.1 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp Pflanzen nach Verwundung. Spross und Wurzel wurden getrennt, verwundet und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile 0; 0,5; 2 und 24 Stunden nach Verwundung analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Da sich in dem System mit getrennt verwundeten Pflanzen insbesondere 0,5 Stunden nach Verwundung deutliche Effekte in Spross und Wurzel zeigten, wurde dieses System und der 0,5 Stunden Zeitpunkt ebenfalls dazu verwendet, um die Gehalte von Galaktolipiden, Arabidopsiden und freien Hydroxyfettsäuren in Wurzel und Spross zu untersuchen.

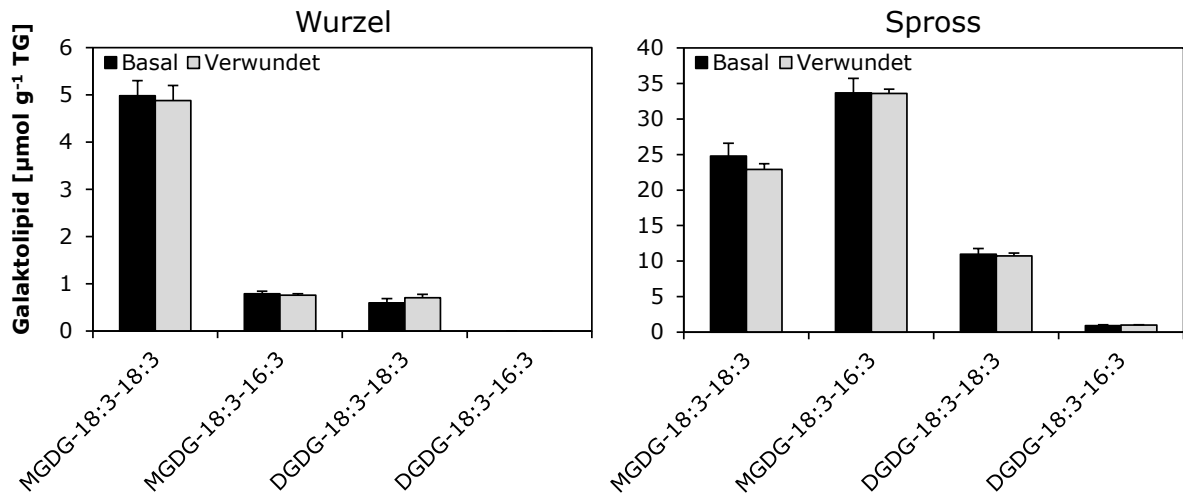


Abbildung 4.2 Galaktolipid Gehalte in Wurzel und Spross nach Verwundung. Spross und Wurzel wurden getrennt, verwundet und die Gehalte verschiedener MGDG und DGDG basal und 0,5 Stunden nach Verwundung analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Wie in Abbildung 4.2 zu sehen, sind in der Wurzel die Gehalte der mit α -Linolensäure (18:3) und/oder Hexadekatriensäure (16:3) veresterten Monogalactosyldiacylglycerole (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerole (DGDG) deutlich geringer als im Spross. Mit $5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ ist MGDG-18:3-18:3 basal in der Wurzel am stärksten vertreten. MGDG-18:3-16:3 und DGDG-18:3-18:3 zeigen mit $0,8$ bzw. $0,6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ deutlich geringere Spiegel und DGDG-18:3-16:3 ist basal in der Wurzel nicht detektierbar. Nach Verwundung gibt es keine Änderung der Galaktolipidspiegel in der Wurzel. Der Spross zeigt im Vergleich zur Wurzel mit $24,8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ basal etwa den fünffachen Gehalt an MGDG-18:3-18:3. Damit stellt MGDG-18:3-18:3 nicht den stärksten Vertreter der Galaktolipide im Spross dar. Dies ist mit $33,7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ MGDG-18:3-16:3. DGDG-18:3-18:3 und DGDG-18:3-16:3 sind mit 11 bzw. $1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TG}$ die im Spross am wenigsten vertretenen Galaktolipide. Wie bei der Wurzel ändert sich nach Verwundung auch im Spross nichts an den Gehalten der verschiedenen Galaktolipide.

Zusätzlich wurden, neben den mit 18:3 und 16:3 veresterten Galaktolipiden, auch die mit ODPA und dnOPDA veresterten Arabidopside in Spross und Wurzel, basal und nach Verwundung, analysiert (Abbildung 4.3). Hierbei zeigt sich deutlich, dass in der Wurzel sowohl basal als auch nach Verwundung keine Arabidopside vorhanden sind. Lediglich Arabidopsid B ist nach Verwundung in sehr geringen Mengen ($2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$) detektierbar. Im Spross sind die Arabidopside A und B basal im Bereich von 35 bzw. $87 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ vertreten. Nach Verwundung steigen diese besonders stark an (33 bzw. $1360 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$). Die basal nicht detektierbaren Arabidopside D und E sind nach Verwundung mit 480 bzw. $550 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ ebenfalls stärker vertreten. Die

Arabidopside C und G sind basal ebenfalls nicht detektierbar, zeigen aber nach Verwundung ebenfalls einen geringen Anstieg auf 102 bzw. 30 nmol g⁻¹ TG.

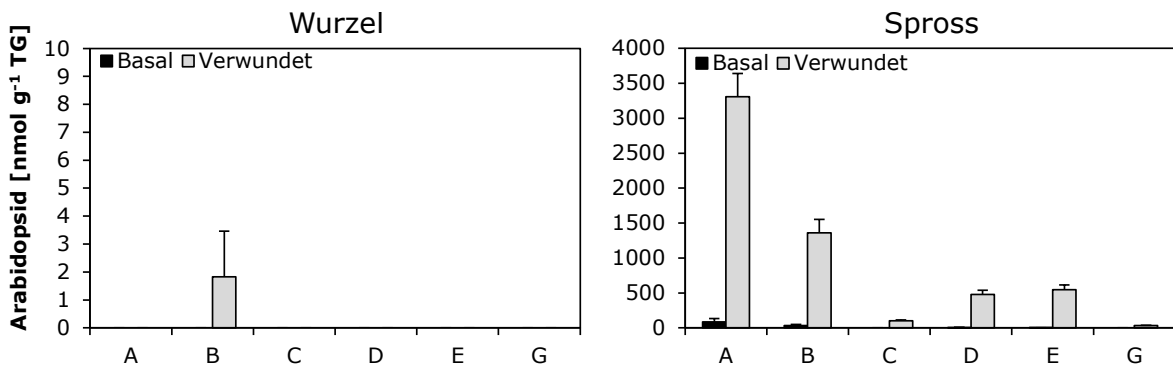


Abbildung 4.3 Arabidopsid Gehalte in Wurzel und Spross nach Verwundung. Spross und Wurzel wurden getrennt, verwundet und die Gehalte der Arabidopside A, B, C, D, E und G basal und 0,5 Stunden nach Verwundung analysiert. (MW+STABW, n= 3)

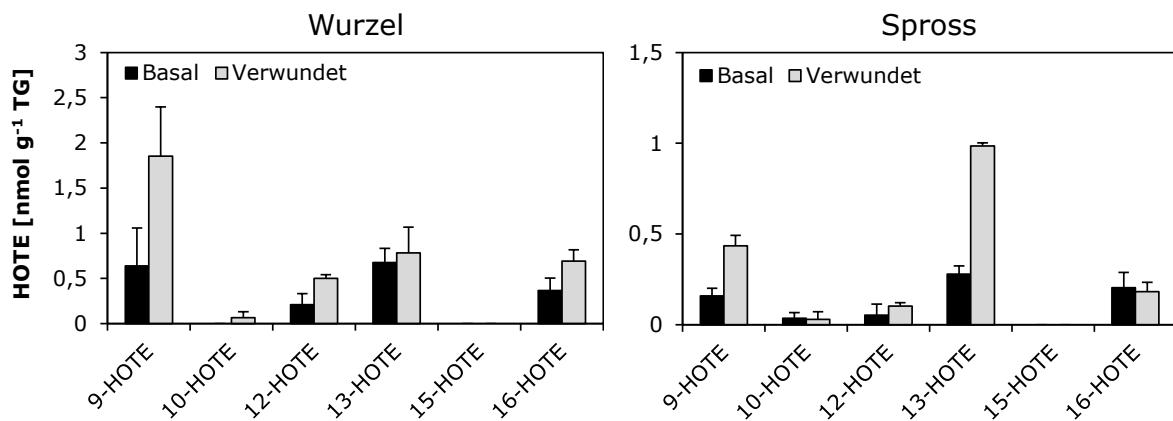


Abbildung 4.4 Freie Hydroxyfettsäure Gehalte in Wurzel und Spross nach Verwundung. Spross und Wurzel wurden getrennt, verwundet und die Gehalte verschiedener freier Hydroxyfettsäuren basal und 0,5 Stunden nach Verwundung analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Die Analyse freier Hydroxyfettsäuren in Spross und Wurzel (Abbildung 4.4) zeigt in beiden Pflanzenteilen ähnliche Konzentrationen im niedrigen nmol g⁻¹ TG Bereich. Betrachtet man die Gehalte der beiden hauptsächlich enzymatisch gebildeten Hydroxyfettsäuren 9- und 13- HOTE, zeigen sich in der Wurzel basal jeweils ähnliche Gehalte um 1 nmol g⁻¹ TG. Nach Verwundung verdoppelt sich der Gehalt an freier 9-HOTE, der freier 13-HOTE hingegen zeigt keinen deutlichen Anstieg. Im Spross ist basal etwa 0,2 nmol g⁻¹ TG 9-HOTE und etwas mehr (0,3 nmol g⁻¹ TG) 13-HOTE vorhanden. Nach Verwundung gibt es hier, umgekehrt zur Wurzel, einen geringen Anstieg des 9-HOTE Levels (0,4 nmol g⁻¹ TG), jedoch eine deutlich stärkere Akkumulation von 13-HOTE (1 nmol g⁻¹ TG). Bei den nicht enzymatisch gebildeten Hydroxyfettsäuren können freie 12- und 16-HOTE in geringen Mengen sowohl im Spross, also auch der Wurzel

detektiert werden. 10 HOTE ist im Spross ebenfalls in sehr geringen Mengen vorhanden ($0.03 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$), in der Wurzel jedoch nur nach Verwundung detektierbar. Freie 15-HOTE konnte weder im Spross, noch in der Wurzel nachgewiesen werden.

4.1.2 Die organspezifische Bildung von Jasmonaten nach Verwundung

Die vorhergegangenen Analysen von Galaktolipiden und Oxylipinen in Wurzel und Spross von *Arabidopsis* Pflanzen zeigten besonders im Bereich der Jasmonate interessante Aspekte. So konnten in Wurzeln sowohl basal als auch nach Verwundung deutliche Mengen von Jasmonaten detektiert werden, obwohl bekannt ist, dass die Expression vieler JA-Biosynthese-Gene in den Wurzeln sehr gering ist. Aus diesem Grund sollte besonders die Bildung von Jasmonaten in Wurzeln in weiteren Experimenten ausführlicher untersucht werden.

Um herauszufinden, ob es einen Austausch von Jasmonaten, deren Prekursoren oder Jasmonat vermittelten Signalen zwischen Spross und Wurzel gibt, welcher die Jasmonat Synthese in der Wurzel beeinflusst, wurden zusätzlich zu getrennt verwundeten Pflanzenteilen auch ganze Pflanzen verwendet. Diesen Pflanzen wurde entweder der Spross oder die Wurzel verwundet (vgl. Abbildung 4.5). Die jeweiligen Pflanzenteile wurden aufgrund der Ergebnisse der Verwundungskinetik (Abbildung 4.1) 0,5 Stunden nach Verwundung geerntet und getrennt analysiert. Für die getrennt verwundeten Pflanzenteile zeigen sich gleiche Ergebnisse wie bei der Kinetik zuvor. Ein starker Anstieg von OPDA, JA und JA-Ile im Spross und ebenfalls ein Anstieg von JA und JA-Ile in der Wurzel. Bei intakten Pflanzen, welche entweder an der Wurzel oder am Spross verwundet wurden, zeigen sich abhängig von der Verwundungsstelle und dem analysierten Gewebe unterschiedliche Effekte. Bei Verwundung des Sprosses einer ganzen Pflanze findet sich im verwundeten Pflanzenteil ein deutlicher Anstieg aller analysierter Jasmonate. Die OPDA-Spiegel erhöhen sich von $3,3$ auf $10,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$, die JA-Gehalte steigen vom Detektionslimit auf $16,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ an und auch JA-Ile steigt vom Detektionslimit auf $2,5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ an. In der Wurzel einer am Spross verwundeten Pflanze ist eine deutliche Reduktion des OPDA-Gehaltes von $3,4$ auf $0,7 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ detektierbar. JA und JA-Ile liegen, wie auch der basale Wert, unter der Detektionsgrenze. Bei Verwundung der Wurzel einer ganzen Pflanze findet sich im Spross ein Rückgang des OPDA-Spiegels von $3,3$ auf $0,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$, wohingegen JA und JA-Ile leicht vom Detektionslimit auf $3,6$ bzw. $1,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ ansteigen. In der verwundeten Wurzel zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie für den Spross. Der OPDA-Gehalt sinkt von $3,4$ auf $1,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ ab, JA und JA-Ile zeigen sehr geringe Anstiege vom Detektionslimit auf $0,5$ bzw. $0,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Verwundung des Sprosses unabhängig davon ob die Pflanze noch ihre Wurzel

besitzt oder nicht zu einem deutlichen Jasmonat-Anstieg im Spross führt. Bei der Wurzel ist dies nicht der Fall. Hier steigen die JA und JA-Ile Gehalte in den Wurzeln nur an, wenn diese vor der Verwundung vom Spross getrennt wurden.

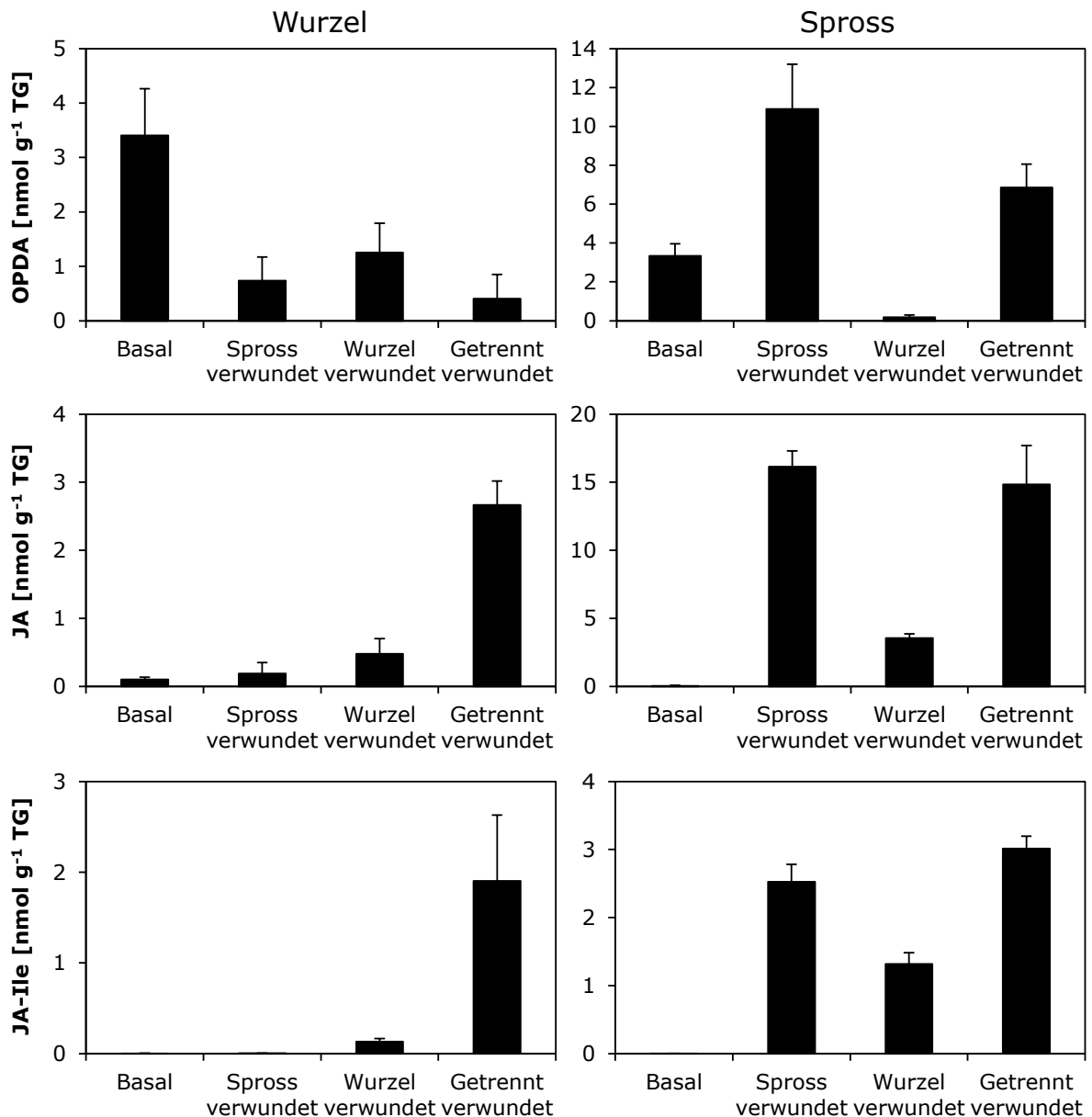


Abbildung 4.5 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross nach Verwundung. Spross bzw. Wurzel ganzer Pflanzen und Wurzel getrennter Pflanzen wurden verwundet. Die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile wurden basal und 0,5 Stunden nach Verwundung analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Besonders die Beobachtung, dass in vom Spross getrennten, verwundeten Wurzeln der JA-Spiegel ansteigt, OPDA jedoch stark abnimmt (Abbildung 4.1) und die daraus resultierenden Fragen, ob OPDA von der Wurzel selbst gebildet werden kann oder ob es einen Transport dieses JA Prekursors vom Spross zur Wurzel gibt sollten geklärt werden. Dazu wurden Pfropfungsexperimente mit der Jasmonat defizienten *dde2*

Mutante und dem korrespondierenden *Arabidopsis* Wildtyp Col-0 durchgeführt. Als Kontrolle wurden zunächst Wildtyp Sprosse mit Wildtyp Wurzeln gepfropft. Mit diesen Pflanzen wurde erneut das getrennte Verwundungsexperiment durchgeführt. Spross und Wurzel wurden getrennt, für 0,5 Stunden verwundet und anschließend die Gehalte an OPDA, JA und JA-Ile analysiert.

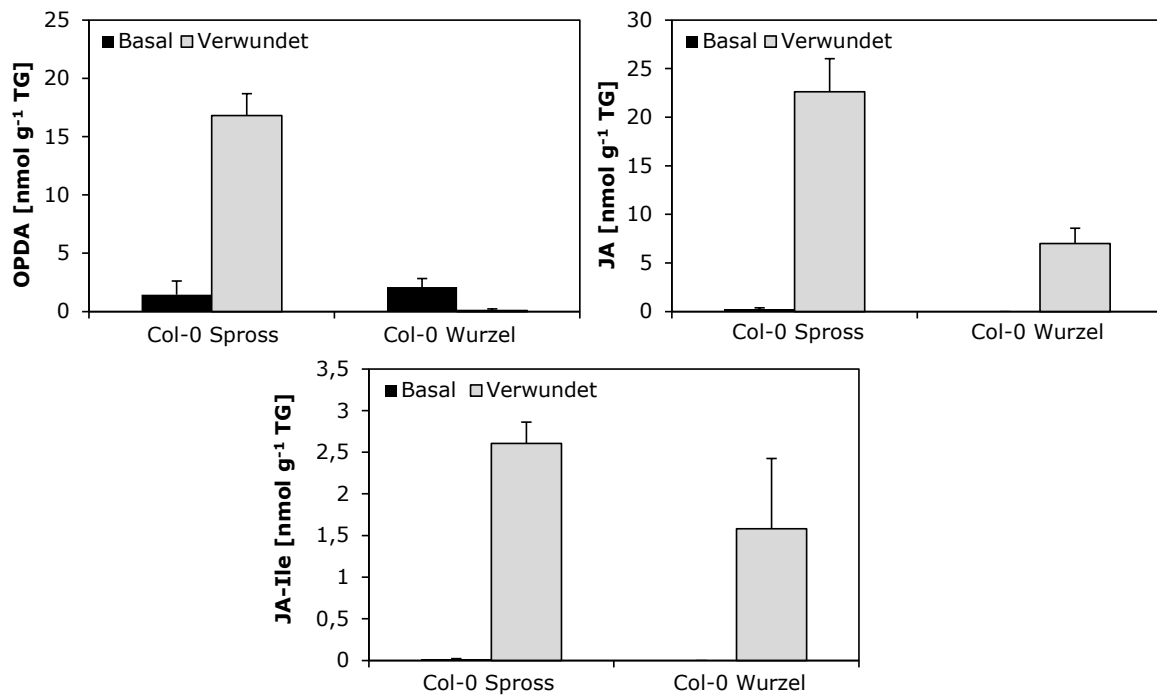


Abbildung 4.6 Jasmonat-Gehalte in Wurzel und Spross gepfropfter Col-0 Pflanzen nach Verwundung. Spross und Wurzel wurden getrennt, verwundet und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile basal und 0,5 Stunden nach Verwundung analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Wie in Abbildung 4.6 zu sehen, zeigen die Ergebnisse die gleiche Tendenz wie zuvor die nicht gepfropften Wildtyp Pflanzen. Die JA und JA-Ile Spiegel zeigen nach Verwundung im Spross und in der Wurzel einen deutlichen Anstieg um das 3 bis 20 fache der basalen Werte. OPDA hingegen nimmt, wie aus den vorherigen Experimenten erwartet, nur im Spross stark zu. In der Wurzel sinkt der Gehalt an OPDA unter die Detektionsgrenze ab.

Da in Abbildung 4.6 gezeigt werden konnte, dass Pfropfen keinen Einfluss auf die Änderung der Jasmonatspiegel in Wurzel und Spross nach Verwundung hat, wurden im folgenden Experiment *dde2* Sprosse mit Wildtyp Wurzeln gepfropft und erneut das getrennte Verwundungsexperiment durchgeführt. Mit diesem Ansatz sollte untersucht werden, ob die Wurzel unabhängig von Spross basales OPDA und nach Verwundung JA bilden kann oder ob die Bereitstellung von OPDA durch den Spross nötig ist.

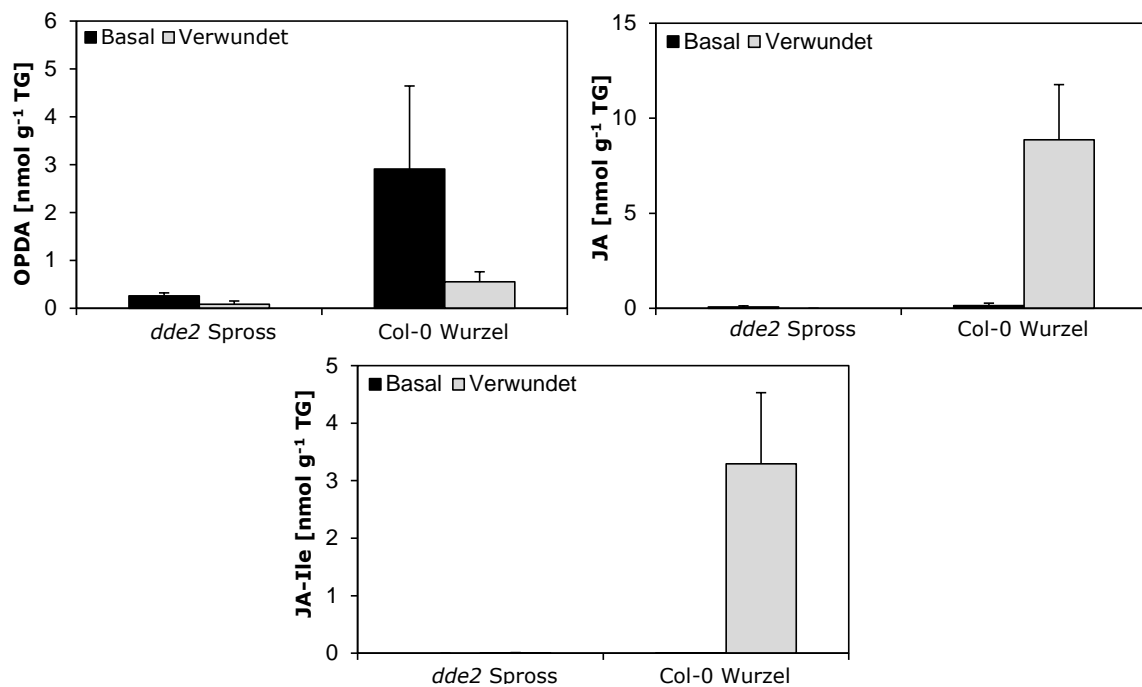


Abbildung 4.7 Jasmonat-Gehalte in Wurzel und Spross gepfropfter *dde2* und Col-0 Pflanzen nach Verwundung. Spross und Wurzel wurden getrennt, verwundet und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile basal und 0,5 Stunden nach Verwundung analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass der *dde2* Spross weder basal noch nach Verwundung eine Akkumulation von OPDA, JA oder JA-Ile zeigt. In der Wildtyp Wurzel hingegen sind sowohl basale OPDA-Spiegel als auch der erwartete Anstieg der JA und JA-Ile Gehalte nach Verwundung zu erkennen. Auch der bereits in vorherigen Experimenten gezeigte Rückgang von OPDA in der Wurzel nach Verwundung ist gegeben. Dies deutet darauf hin, dass die Wurzeln Jasmonate unabhängig vom Spross bilden können.

Da während des Pfropfens immer ein Stück des Hypokotyls beider Pflanzen erhalten bleibt und so nicht ganz auszuschließen war, dass der kleine Rest des Hypokotyls der Wildtyp Wurzel für die Bildung der basalen OPDA-Spiegel in der Wurzel verantwortlich ist (siehe Abbildung 4.7), wurden, zusätzlich zu den vorherigen Pfropfungsexperimenten, auch Wildtyp Sprosse mit *dde2* Wurzeln gepfropft. So konnte zudem untersucht werden, ob es einen Transport von Jasmonaten aus dem Spross in die Wurzel gibt.

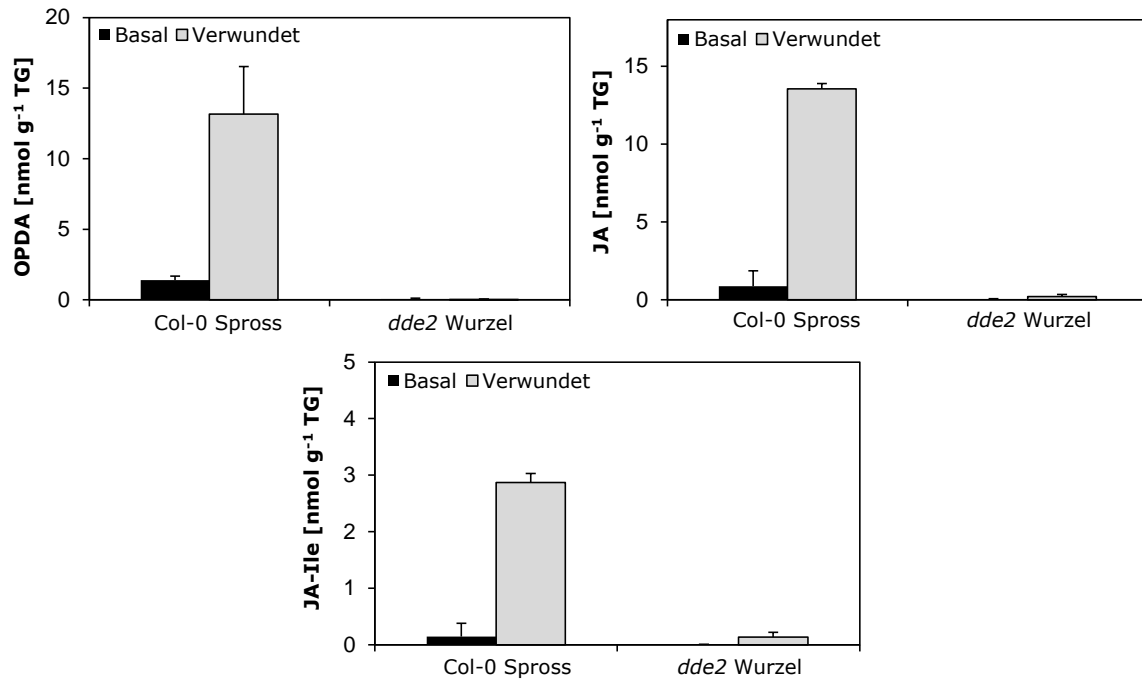


Abbildung 4.8 Jasmonat-Gehalte in Wurzel und Spross gepfropfter Col-0 und *dde2* Pflanzen nach Verwundung. Spross und Wurzel wurden getrennt, verwundet und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile basal und 0,5 Stunden nach Verwundung analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, zeigt der Wildtyp Spross nach Verwundung den erwarteten Anstieg von OPDA, JA und JA-Ile. Für die *dde2* Wurzel können weder die für den Wildtyp typischen basalen OPDA-Spiegel von etwa 2 nmol g⁻¹ TG detektiert werden, noch ist der ebenfalls beim Wildtyp verzeichnete Anstieg von JA und JA-Ile nach Verwundung vorhanden. Demnach gibt es keinen Transport von Jasmonaten aus dem Spross oder dem Hypokotyl in die Wurzel.

4.2 Unterschiedliche Beteiligung von 13-Lipoxygenasen an der Jasmonatproduktion nach Stress

4.2.1 Expressionsanalyse von 13-Lipoxygenasen nach Verwundung

Nachdem in den vorherigen Experimenten untersucht wurde, ob *Arabidopsis* Wurzeln selbständig Jasmonate bilden können, wurde in den folgenden Experimenten näher darauf eingegangen, durch welche LOX die Bildung von Jasmonaten in der Wurzel katalysiert wird. Wie bereits zuvor erwähnt, gibt es in *Arabidopsis* vier verschiedene 13-LOX Enzyme, für die bereits einige spezifische Funktionen beschrieben sind. Um zunächst einen Überblick über die Expression der vier LOX Gene, in Spross und besonders der Wurzel, unter den verwendeten Bedingungen zu erhalten, wurde deren Expression basal und nach demselben getrennten Verwundungssystem, wie in den Experimenten zuvor, betrachtet.

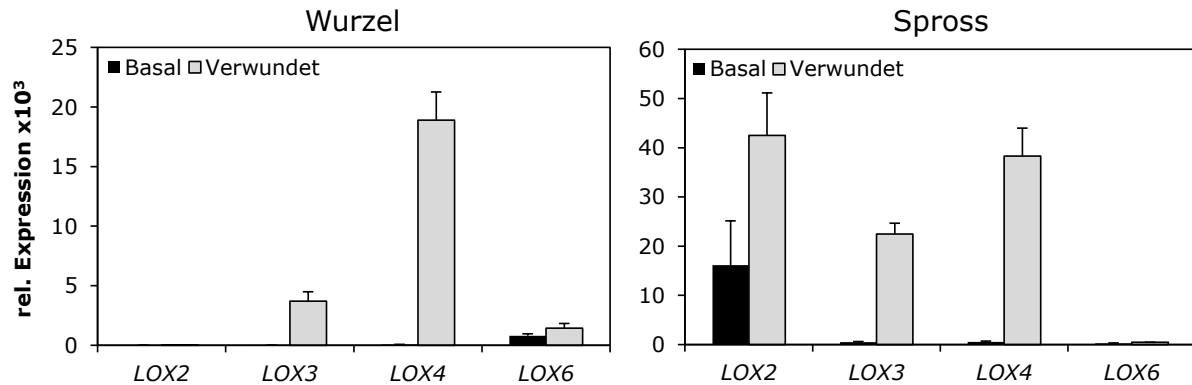


Abbildung 4.9 13-LOX Expression in Wurzel und Spross von Wildtyp Pflanzen nach Verwundung. Spross und Wurzel wurden getrennt, verwundet und die relative Genexpression basal und 0,5 Stunden nach Verwundung mittels qRT-PCR analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Wie in Abbildung 4.9 zu erkennen, unterscheidet sich das Expressions-Muster der verschiedenen 13-LOX Gene in Spross und Wurzel deutlich voneinander. In der Wurzel sind die relativen Transkriptlevel von LOX2, 3 und 4 mit 5, 7 bzw. 55 Transkripten sehr niedrig. Die Expression von LOX2 bleibt auch nach Verwundung weiterhin sehr gering (12 Transkripte), wohingegen die Expression von LOX3 und LOX4 mit 3700 bzw. 18900 Transkripten stark zunimmt. Als einziges der 4 LOX Gene ist in der Wurzel für die LOX6 eine deutliche basale Expression (800 Transkripte) messbar. Deren Expression steigt nach Verwundung auf 1400 Transkripte an. Im Blatt ist die Situation anders. Hier sind basal bei LOX3, 4 und 6 mit 500, 530 bzw. 250 nur geringe Transkriptmengen zu verzeichnen. Umgekehrt zur Wurzel gibt es hier nach Verwundung keinen starken Anstieg der LOX6 Expression (460 Transkripte) dafür jedoch eine starke Zunahme der LOX2 Transkriptmenge von basal 16000 auf 43000 Transkripte nach Verwundung. LOX3 und 4 zeigen, wie bereits in der Wurzel, auch im Spross nach Verwundung eine erhöhte Expression (22000 bzw. 38000 Transkripte).

4.2.2 Jasmonatspiegel in verschiedenen 13-LOX-Mutanten nach Verwundung

Zusätzlich zur Analyse der Expressionsmuster der einzelnen 13-LOX Gene im Wildtyp wurde das, zuvor bereits häufig verwendete, getrennte Verwundungsexperiment mit unterschiedlichen LOX KO Mutanten durchgeführt und deren Jasmonatspiegel analysiert. Dazu wurden *lox2* und *lox6* Einzelmutanten, sowie eine *lox3/4* Doppelmutante verwendet.

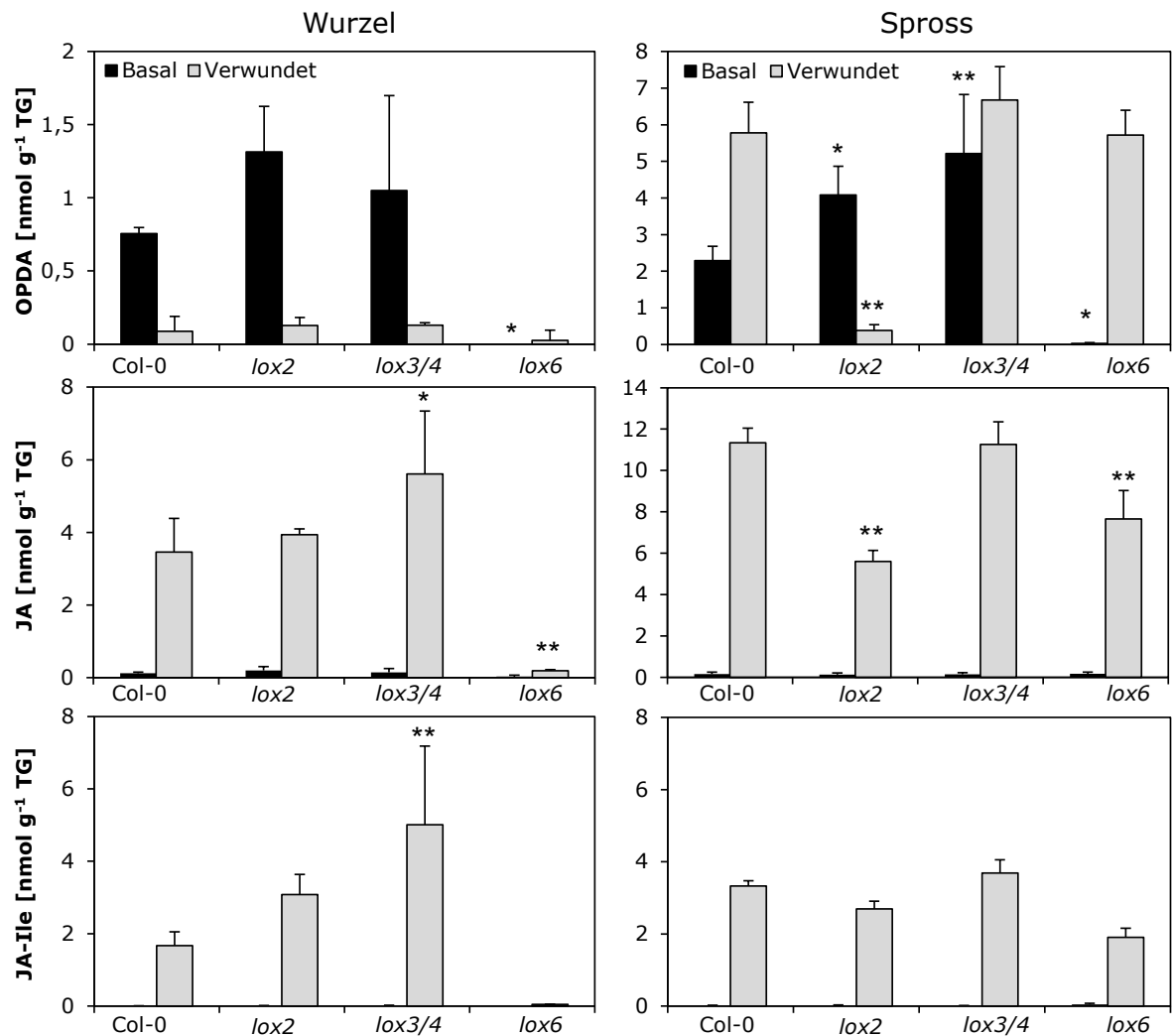


Abbildung 4.10 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp und LOX-Mutanten nach Verwundung. Spross und Wurzel wurden getrennt, verwundet und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile basal und 0,5 Stunden nach Verwundung analysiert. (MW+STABW, n= 3, * p<0,05, ** p<0,01, ANOVA, LSD-Test)

Die Ergebnisse (Abbildung 4.10) zeigen für die Wurzel keine starken Unterschiede in den Jasmonatspiegeln der *lox2* und *lox3/4* Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Obwohl die Expression von *LOX3* und *LOX4* in Wurzeln nach Verwundung stark zunimmt (Abbildung 4.9) sind die JA und JA-Ile Spiegel in der *lox3/4* Mutante in dieser Situation, in Vergleich zum Wildtyp, sogar leicht erhöht (5,6 zu 3,5 bzw. 5,0 zu 1,7 nmol g⁻¹ TG). Für die *lox6* Mutante lassen sich hingegen weder basale OPDA-Spiegel, noch der für dieses Verwundungsexperiment erwartete Anstieg von JA und JA-Ile nach Verwundung detektieren. Auch im Spross ist in der *lox6* Mutante basal kein OPDA quantifizierbar. Jedoch ist, im Unterschied zur Wurzel, nach Verwundung der OPDA-Spiegel in der *lox6* Mutante mit 5,7 nmol g⁻¹ TG gleich hoch wie im Wildtyp (5,8 nmol g⁻¹ TG). Die JA und JA-Ile Level der *lox6* Mutante sind im Spross im Vergleich zum Wildtyp reduziert (7,7 nmol g⁻¹ TG zu 11,3 nmol g⁻¹ TG bei JA und 1,9 nmol g⁻¹ TG zu 3,3 nmol g⁻¹ TG bei JA-Ile). Bei der *lox3/4* Mutante ist der basale OPDA-Spiegel im Vergleich zum Wildtyp

erhöht (4,1 zu 2,3 nmol g⁻¹ TG). Nach Verwundung finden sich, im Vergleich zum Wildtyp, jedoch keine deutlichen Unterschiede in den Jasmonat-Gehalten. Die stärksten Effekte im Spross sind bei der *lox2* Mutante zu finden. Dies wurde bereits erwartet, da die LOX2 als eine der wichtigsten LOX Enzyme für die Jasmonatproduktion nach Stress in Blättern bekannt ist (Bell et al., 1995; Glauser et al., 2009). In dieser Mutante ist nach Verwundung ein Rückgang der OPDA-Spiegel von 4,1 auf 0,4 nmol g⁻¹ TG zu verzeichnen. Der Anstieg von JA nach Verwundung ist im Vergleich zum Wildtyp um 50% reduziert und auch der JA-Ile Spiegel ist, mit 2,7 nmol g⁻¹ TG, geringer als im Wildtyp (3,3 nmol g⁻¹ TG). Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die LOX6 als einziges der verschiedenen LOX Enzyme in *Arabidopsis* in der Wurzel an der Bildung von Jasmonaten nach Verwundung beteiligt ist.

4.2.3 Jasmonatspiegel nach Stress intakter Pflanzen

Das in den vorherigen Versuchen verwendete Verwundungssystem, mit getrennt verwundeten Sprossen und Wurzeln, ist ein sehr künstliches System. Da jedoch bei Verwundung von Wurzeln oder Sprossen intakter Pflanzen keine sehr starken Änderungen in den Jasmonatspiegeln der Wurzel stattfanden, wurden im Folgenden andere Stresse, welche an intakten Pflanzen durchgeführt wurden, hinsichtlich eines Anstieges der Jasmonatspiegel in den Wurzeln untersucht. Zu den getesteten Stressen zählen Salzstress, Kältestress, osmotischer Stress und Trockenstress.

Für den Salzstress wurden Pflanzen mit NaCl behandelt, indem das Medium der Pflanzen durch 150 mM NaCl-Lösung ausgetauscht wurde. Die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile wurden nach 0, 1, 6 und 24 Stunden analysiert (Abbildung A.1). Dieses Experiment zeigt bei den Wurzeln keinen Anstieg von Jasmonaten. Die basalen OPDA-Spiegel sinken nach 6 Stunden von 1,4 nmol g⁻¹ TG unter die Detektionsgrenze ab. Zudem zeigt sich kein Effekt auf die JA-Spiegel. Für JA-Ile kann nach 1h ein leichter Anstieg detektiert werden, welcher jedoch nach 6 Stunden wieder verschwunden ist. Im Spross zeigt sich nach 6 Stunden ebenfalls ein Absinken des basalen OPDA-Spiegels von 0,8 nmol g⁻¹ TG unter die Detektionsgrenze. Nach 24 Stunden ist der Wert jedoch wieder auf basal Niveau (0,9 nmol g⁻¹ TG). Für JA und JA-Ile lässt sich nach 24 Stunden ein geringer Anstieg der Spiegel auf 0,3 bzw. 0,1 nmol g⁻¹ TG detektieren. Aufgrund der geringen Änderungen der Jasmonatspiegel und des fehlenden Anstiegs von Jasmonaten in der Wurzel wurden die Untersuchungen hinsichtlich Salzstress nicht weiterverfolgt. Ebenfalls nicht weiterverfolgt wurden Untersuchungen hinsichtlich Kältestress. Hierfür wurde das Medium der Pflanzen durch ein Eisbad gekühlt und ebenfalls die OPDA, JA und JA-Ile Gehalte nach 0, 1, 6 und 24 Stunden untersucht (Abbildung A.2). Es konnten

weder in der Wurzel, noch im Spross, Änderungen der basalen Jasmonat Spiegel beobachtet werden.

4.2.4 Jasmonat- und ABA-Spiegel nach osmotischem Stress

Es ist bereits bekannt, dass die Flotierung von *Arabidopsis* Blättern auf 0,5 M Sorbitol-Lösung zu einem starken Anstieg von Jasmonaten führt (Seltmann et al., 2010). Deshalb wurde dieser osmotische-Stress mit den intakten Hydrokulturlpflanzen getestet. Dazu wurde das Medium der Pflanzen durch 0,5 M Sorbitol-Lösung ersetzt und die OPDA, JA und JA-Ile Gehalte nach 0, 1, 6, und 24 Stunden analysiert.

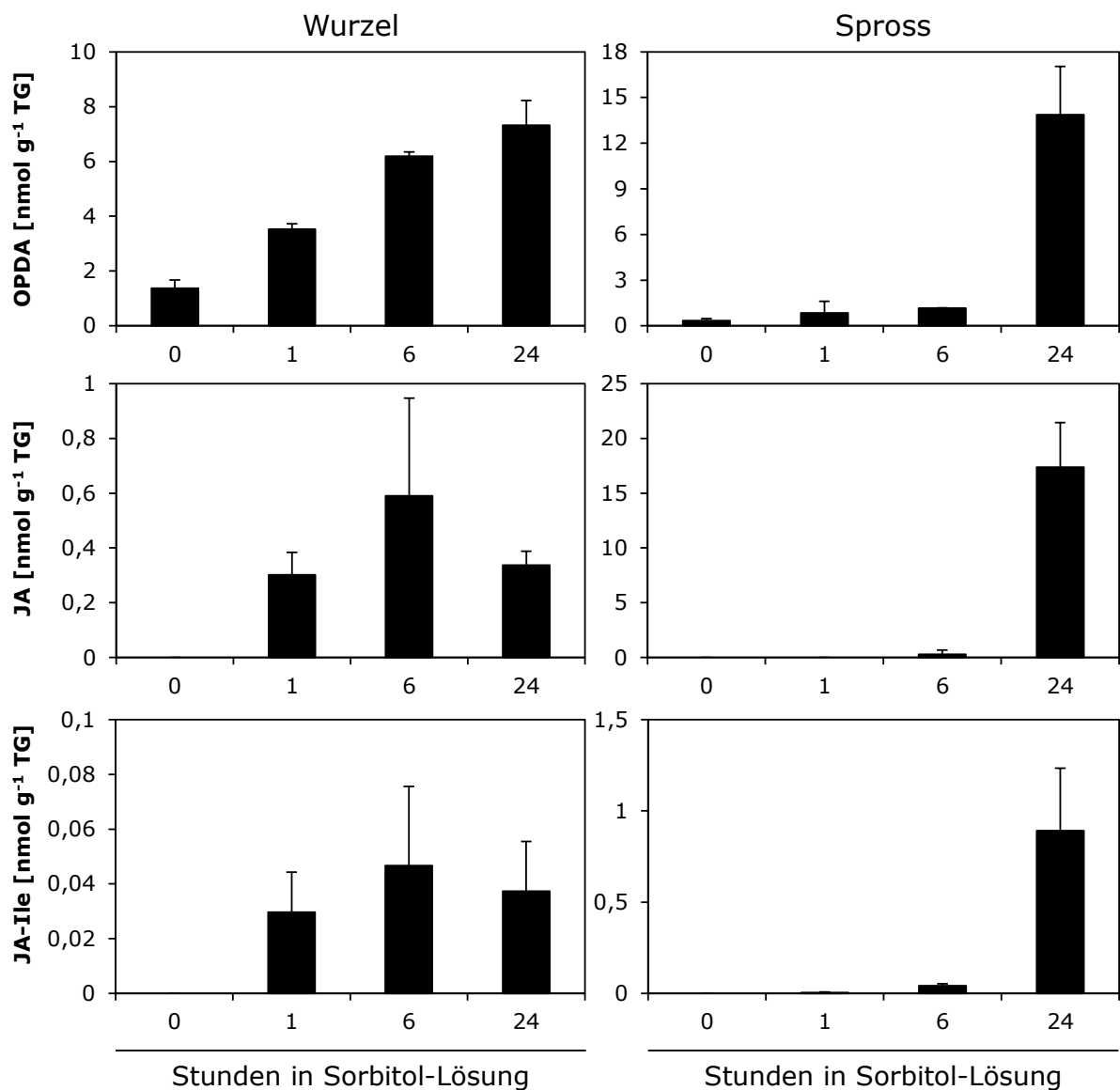


Abbildung 4.11 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp Pflanzen nach osmotischem-Stress. Das Medium der Pflanzen wurde durch 0,5 M Sorbitol-Lösung ersetzt und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile nach 0, 1, 6 und 24 Stunden analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Wie in Abbildung 4.11 dargestellt findet in der Wurzel bereits 1 Stunde nach Behandlung mit 0,5 M Sorbitol-Lösung ein leichter Anstieg von OPDA (1,4 auf 3,5 nmol g⁻¹ TG) statt, welcher sich in den nächsten 24 Stunden weiter auf 7,3 nmol g⁻¹ TG erhöht. Die JA und JA-Ile Gehalte zeigen ebenfalls bereits nach einer Stunde einen sehr geringen Anstieg von der Detektionsgrenze auf 0,3 bzw. 0,03 nmol g⁻¹ TG. Diese Spiegel steigen jedoch im Laufe der nächsten 24 Stunden nicht weiter an. Im Spross zeigt sich eine andere Kinetik. Hier ist erst nach 24 Stunden eine deutliche Änderung der Jasmonat Spiegel zu verzeichnen. Die Gehalte sind dann jedoch deutlich höher als die der Wurzel. Sie liegen bei 13,9 nmol g⁻¹ TG für OPDA, 17,4 nmol g⁻¹ TG für JA und 0,9 nmol g⁻¹ TG für JA-Ile.

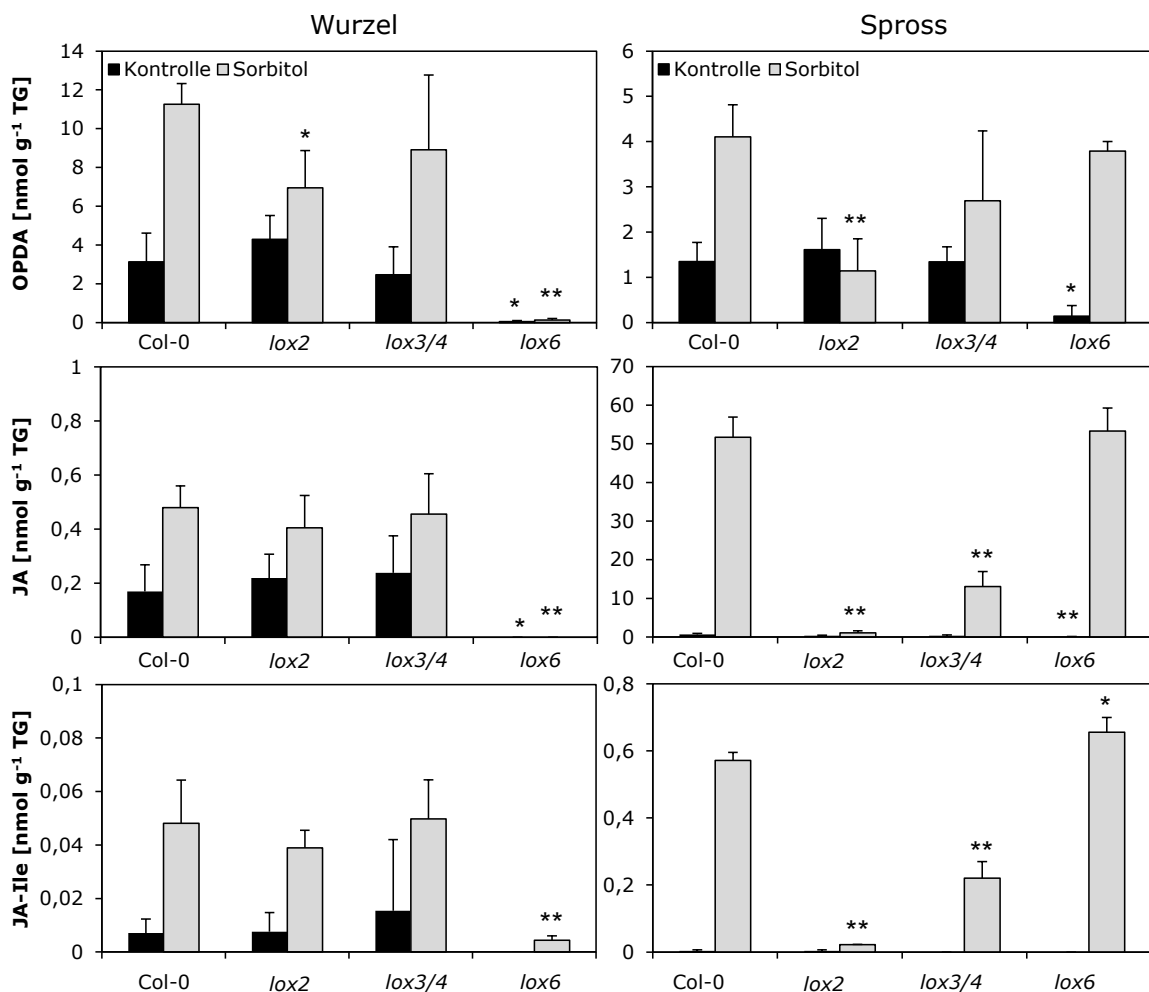


Abbildung 4.12 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp und LOX-Mutanten nach osmotischem Stress. Das Medium der Pflanzen wurde durch 0,5 M Sorbitol-Lösung ersetzt und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile nach 24 Stunden analysiert. Als Kontrolle wurde statt Sorbitol-Lösung Wasser verwendet. (MW+STABW, n= 3, * p<0,05, ** p<0,01, ANOVA, LSD-Test)

Die selbe Sorbitol-Behandlung wie für die Kinetik (Abbildung 4.11) wurde anschließend mit den verschiedenen, bereits im Verwundungsexperiment verwendeten, 13 LOX-

Mutanten durchgeführt, um zu testen, welches der LOX Enzyme unter diesen Bedingungen eine Funktion, besonders in der Wurzel, besitzt. Da bei der zuvor durchgeführten Kinetik im Spross erst nach 24 Stunden eine deutliche Änderung der Jasmonat Spiegel zu verzeichnen war, wurde für dieses Experiment nur der 24 Stunden Wert verwendet.

Betrachtet man die Ergebnisse der Sorbitol-Behandlung der verschiedenen LOX-Mutanten (Abbildung 4.12) zeigt sich, dass auch in diesem Fall, wie bereits nach Verwundung, in den Wurzeln *lox3/4* Mutanten keine Unterschiede zum Wildtyp vorliegen. Bei beiden Linien gibt es die anhand der Kinetik erwartete Zunahme der OPDA, JA und JA-Ile Gehalte. Die *lox2* Mutante zeigt in der Wurzel ebenfalls Anstiege aller drei Jasmonate, die Zunahme von OPDA ist jedoch in Vergleich zum Wildtyp geringer. In den Wurzeln der *lox6* Mutante ist bei Sorbitol-Stress, wie bereits nach Verwundung, kein Jasmonat Anstieg detektierbar. Zudem können sowohl in der Wurzel als auch im Spross in dieser Mutante, wie bereits zuvor gezeigt, wieder signifikant niedrigere OPDA-Spiegel detektiert werden. Im Spross der *lox3/4* Mutante steigen, wie im Wildtyp, alle drei gemessenen Jasmonate, jedoch in geringerem Maße, an. Die *lox2* Mutante zeigt im Spross keinen Anstieg der Jasmonat-Gehalte nach Sorbitol-Behandlung.

Da der durch die Sorbitol-Behandlung ausgelöste, osmotische-Stress zum Welken der Pflanze führt, wurden neben den untersuchten Jasmonaten auch die ABA-Gehalte der Pflanzen analysiert (Abbildung 4.13). Dabei zeigte sich sowohl in der Wurzel als auch im Spross ein deutlicher Anstieg von ABA im Wildtyp und allen Mutanten. Die ABA-Gehalte lagen mit etwa 1 nmol g⁻¹ TG nach Sorbitol-Behandlung in der Wurzel deutlich unter denen der Sprosse (etwa 13 nmol g⁻¹ TG).

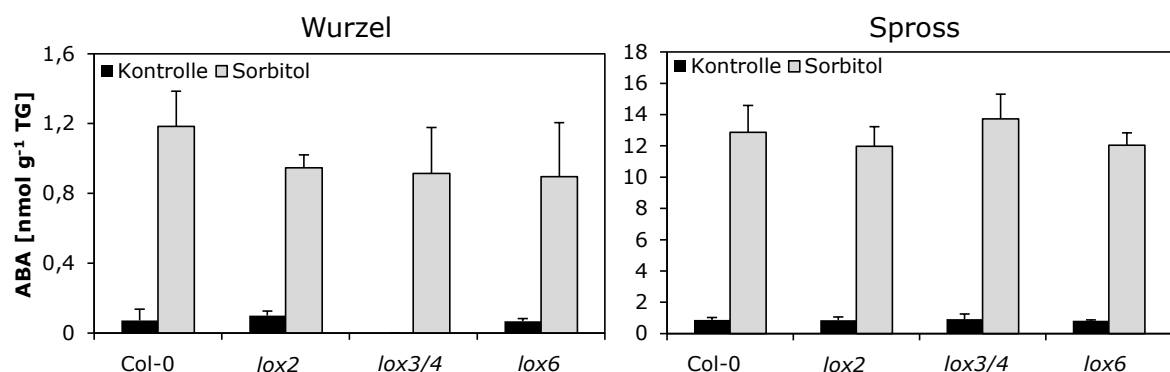


Abbildung 4.13 ABA Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp und LOX-Mutanten nach osmotischem Stress. Das Medium der Pflanzen wurde durch 0,5 M Sorbitol-Lösung ersetzt und die ABA-Gehalte nach 24 Stunden analysiert. Als Kontrolle wurde statt Sorbitol-Lösung Wasser verwendet. (MW+STABW, n= 3)

4.2.5 Jasmonat- und ABA-Spiegel nach Trockenstress

Zusätzlich zu dem durch Sorbitol ausgelösten osmotischem Stress, welcher zum Welken der Pflanzen führt, wurde untersucht, ob auch Trockenheit eine Änderung der Jasmonatspiegel, besonders in den Wurzeln, hervorrufen kann, da auch bei diesem Stress Welke-Erscheinungen die Folge sind. Dazu wurde zunächst bei 6 Wochen alten Col-0 Pflanzen für 24 bzw. 48 Stunden das Flüssigmedium aus den Kisten des hydroponischen Anzuchtssystems entfernt und anschließend die OPDA und JA-Spiegel von Wurzel und Spross analysiert.

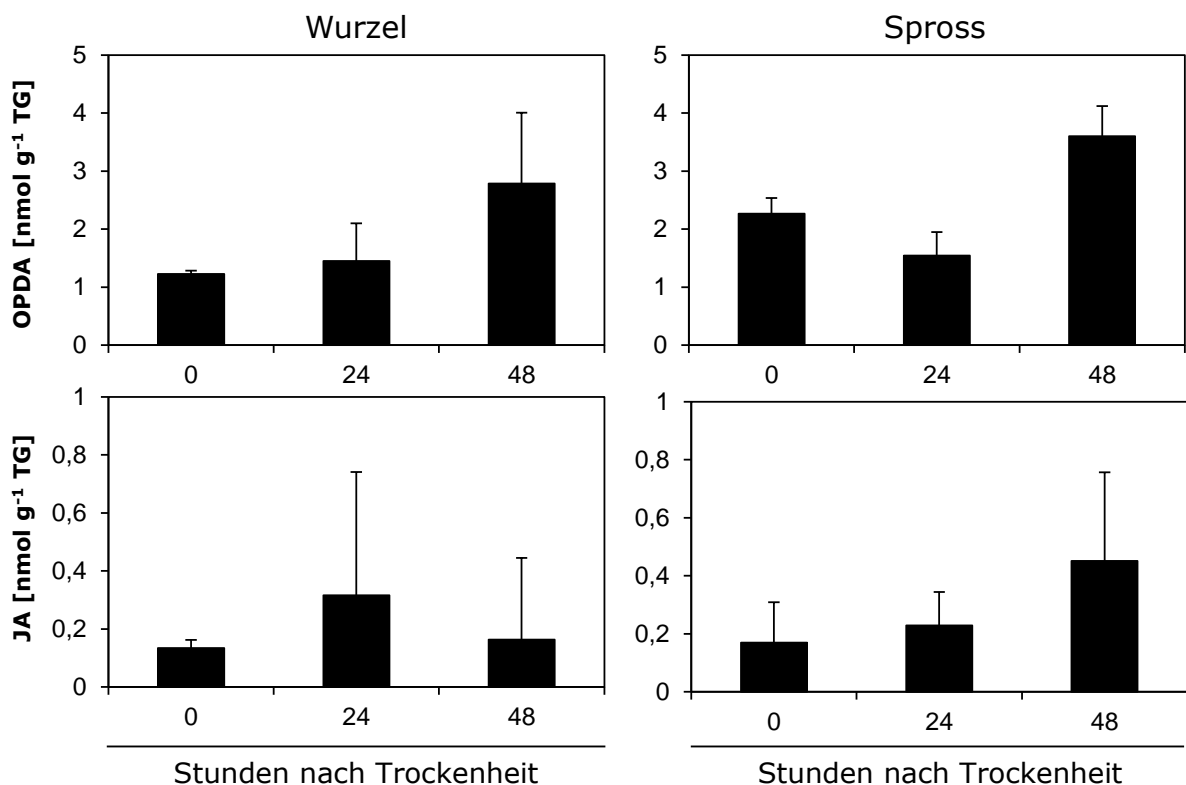


Abbildung 4.14 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp Pflanzen nach Trockenstress. Das Medium der Pflanzen wurde entfernt und die Gehalte von OPDA und JA nach 0, 24 und 48 Stunden analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Wie in Abbildung 4.14 dargestellt, ist in der Wurzel nach 24 Stunden Trockenheit keine Änderung des OPDA-Gehaltes detektierbar, nach 48 Stunden steigt der Gehalt jedoch von $1,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ auf $2,8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ an. Der JA-Spiegel ist nach 24 Stunden leicht erhöht, zeigt nach 48 Stunden jedoch keinen Unterschied zum basalen Wert ($0,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$). Im Spross gibt es nach 24 Stunden ebenfalls keine deutlichen Änderungen der OPDA- und JA-Gehalte, nach 48 Stunden sind bei beiden Jasmonaten jedoch Anstiege erkennbar. Für OPDA ein Anstieg von $2,3$ auf $3,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ und für JA von $0,2$ auf $0,5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$.

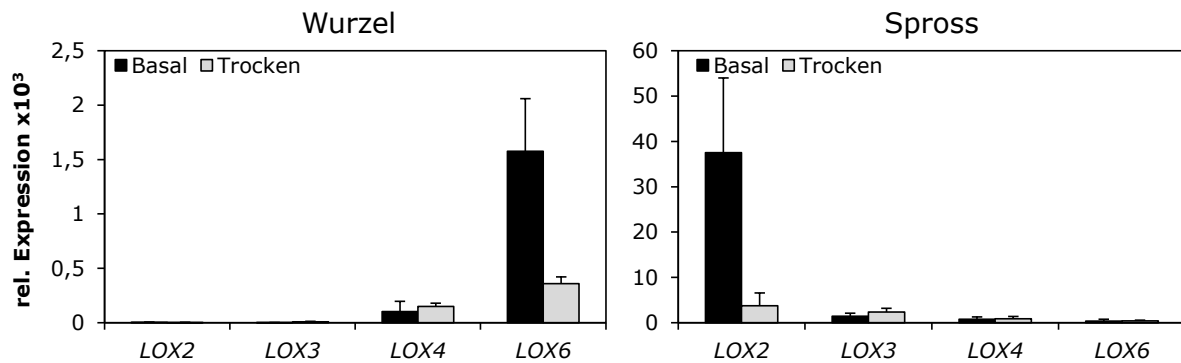


Abbildung 4.15 13-LOX Expression in Wurzel und Spross von Wildtyp Pflanzen nach Trockenstress. Das Medium der Pflanzen wurde entfernt und die relative Genexpression basal und nach 48 Stunden mittels qRT-PCR analysiert. (MW+STABW, n= 3)

Um zu ermitteln, ob sich der Anstieg der Jasmonate nach Trockenheit auch in der Genexpression der verschiedenen 13-LOX Gene widerspiegelt, wurden diese basal und nach 48 Stunden Trockenheit analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass es zu keinem Anstieg der Expression kommt, sondern die basale Expression von *LOX6* in der Wurzel sinkt nach Trockenheit deutlich von 158 auf 36 Transkripte ab. Ebenso nimmt im Spross die basale *LOX2* Expression von 3800 Transkripten auf 400 ab.

Wie bereits für den Verwundungs- und Sorbitol-Stress, wurden auch für Trockenheit die OPDA, JA und JA-Ile Spiegel in Wurzel und Spross der verschiedenen LOX-Mutanten getestet. Dazu wurde der 48 Stunden Wert ausgewählt. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Auch bei diesem Experiment zeigen sich in den Wurzeln der *lox2* Mutante keine starken Unterschiede zum Wildtyp. In beiden Linien gibt es nach 48 Stunden Trockenheit nur einen leichten Anstieg der OPDA- und JA-Spiegel. JA-Ile liegt an der Detektionsgrenze, zeigt aber ebenfalls einen sehr geringen Anstieg. Bei der *lox3/4* Mutante sind in der Wurzel ebenfalls nur geringe Anstiege bei JA und JA-Ile zu verzeichnen, welche sich kaum vom Wildtyp unterscheiden. Der OPDA-Gehalt hingegen steigt nach Trockenheit auf $13,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ im Vergleich zum Wildtyp ($6,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$) signifikant an. In den Wurzeln der *lox6* Mutante kann, wie bei den Experimenten zuvor, weder basal noch nach Stresseinwirkung OPDA, JA oder JA-Ile detektiert werden. Im Spross gibt es im Gegensatz zur Trockenheitskinetik (Abbildung 4.14) beim Wildtyp keinen Unterschied zwischen basalem OPDA und 48 Stunden Trockenheit ($2,1$ bzw. $2,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$). In der *lox2* und *lox3/4* Mutante ist jedoch eine ähnliche Tendenz wie bereits nach Sorbitol-Stress zu erkennen. Bei *lox2* zeigt sich ein Rückgang von basal $2,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ OPDA auf $0,7 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ nach Trockenheit und bei *lox3/4* gibt es einen Anstieg von basal $0,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ OPDA auf $1,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ nach Trockenheit. Mit $0,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ TG}$ ist in der *lox6* Mutante im Spross sehr wenig basales OPDA detektierbar.

Anders als bei Sorbitol-Stress gibt es nach Trockenheit jedoch keinen Anstieg. JA liegt im Spross an der Detektionsgrenze. Es gibt jedoch für Col-0, *lox2* und *lox3/4* die Tendenz zu einem geringen Anstieg der JA-Spiegel. JA-Ile war im Spross nicht detektierbar.

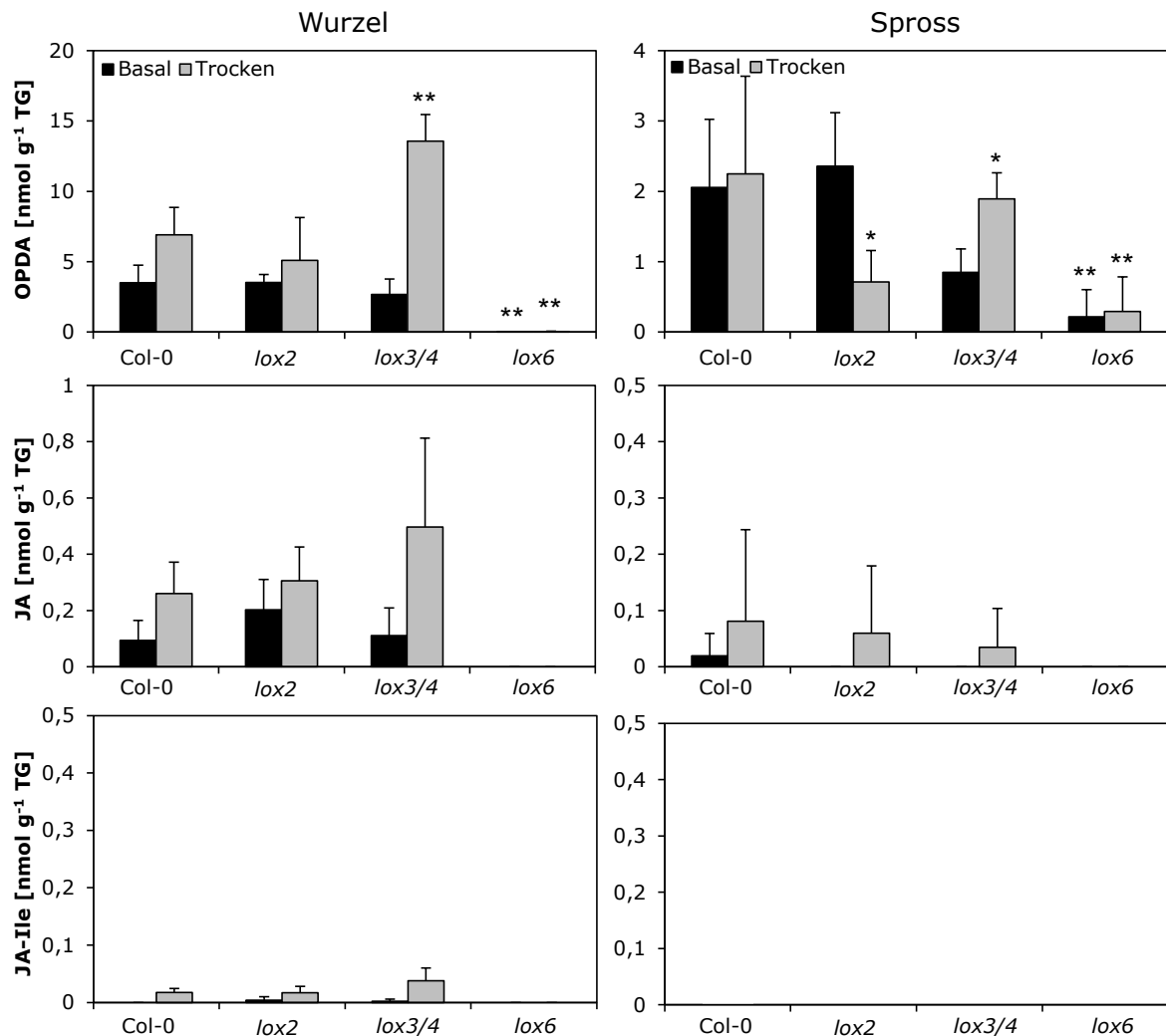


Abbildung 4.16 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp und LOX-Mutanten nach Trockenstress. Das Medium der Pflanzen wurde entfernt und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile basal und nach 48 Stunden analysiert. (MW+STABW, n= 4, * p<0,05, ** p<0,01, ANOVA, LSD-Test)

Um nachzuweisen, dass das verwendete System zur Untersuchung von Trockenstress wirklich Einfluss auf den Wasserhaushalt der Pflanze hat, wurden zusätzlich zu den gemessenen Jasmonaten auch die ABA-Spiegel von Wurzel und Spross analysiert (Abbildung 4.17). Hierbei zeigte sich, wie bereits bei der Sorbitol-Behandlung (Abbildung 4.13), ein starker Anstieg der ABA-Gehalte nach Trockenstress in Wurzel und Spross des Wildtyps und aller Mutanten auf je 2 - 3,5 nmol g⁻¹ TG.

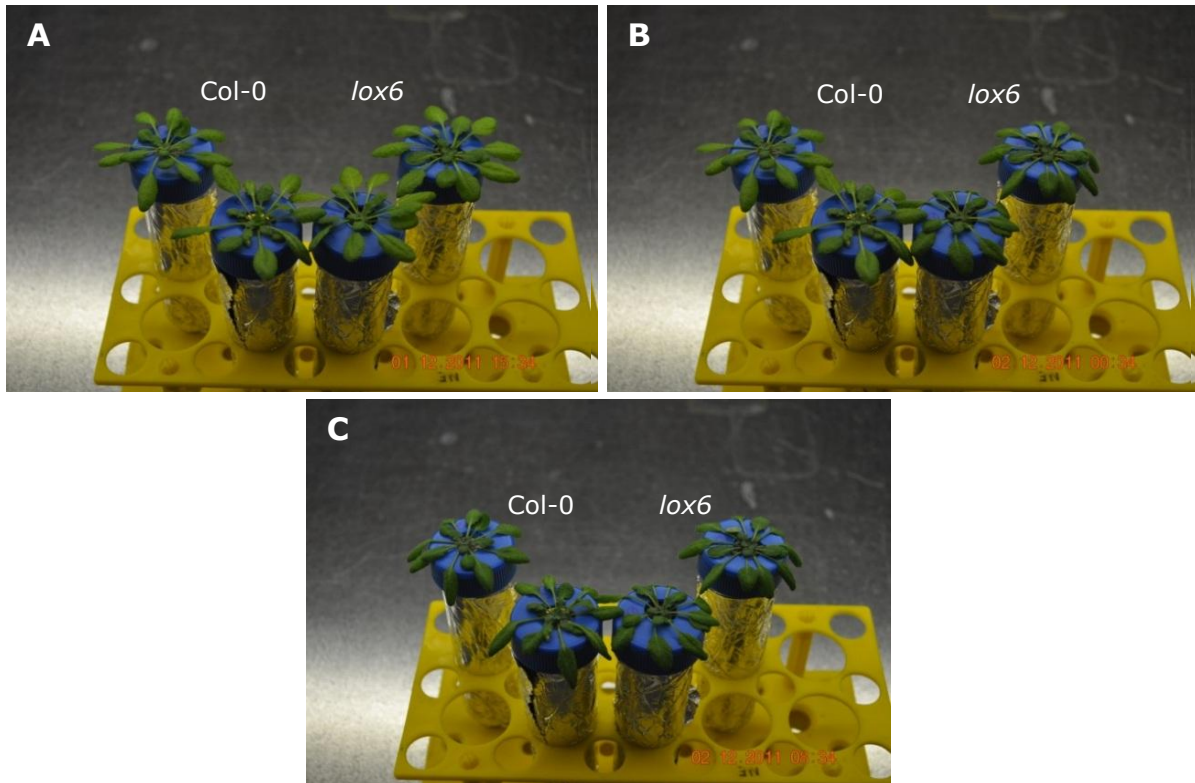


Abbildung 4.18 Welke-Phänotyp von je zwei hydroponisch angezogenen Col-0 (links) und *lox6* (rechts) Pflanzen. 5 Wochen alten Pflanzen wurde das Medium entfernt und das fortschreitende Welken bei Dauerlicht, 24°C durch Fotos nach A: 0, B: 9 und C: 17 Stunden dokumentiert.

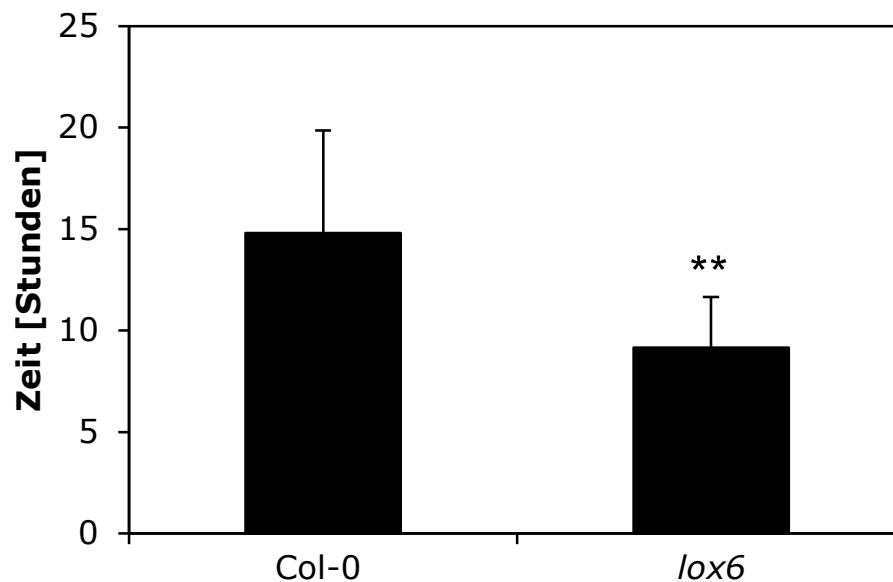


Abbildung 4.19 Welke-Zeit hydroponisch angezogener Col-0 und *lox6* Pflanzen in Stunden. Die Pflanzen wurden als gewelkt gewertet, wenn mindestens fünf Blätter einen deutlichen Turgor-Verlust aufwiesen. (MW+STABW, n= 14, ** p<0,01, t-Test unabhängiger Stichproben)

Um zu untersuchen, ob die im hydroponischen System ermittelten Unterschiede in der Welke-Zeit von Col-0 und *lox6* Pflanzen durch Jasmonate oder durch andere über den 13-LOX-Weg gebildete Oxylipine ausgelöst werden, wurden zusätzlich *dde2* Pflanzen verwendet. Dazu wurden in Erde angezogene Pflanzen hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber Trockenheit getestet. Zunächst wurde der Wassergehalt der Rosetten von Col-0, *lox6* und *dde2* Pflanzen nach 16, 20 und 22 Tagen Trockenheit bestimmt (Abbildung 4.20).

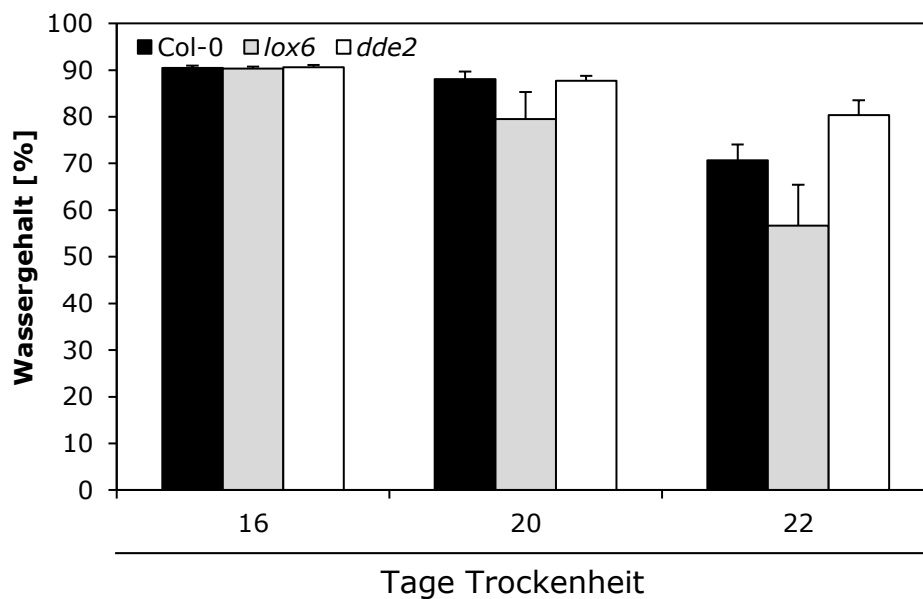


Abbildung 4.20 Wassergehalt von Col-0, *lox6* und *dde2* Pflanzen nach 16, 20 und 22 Tagen Trockenheit in %. (MW+STABW, n=3)

Nach 16 Tagen Trockenheit liegt der Wassergehalt in allen drei Pflanzenlinien bei etwa 90%. 4 Tage später ist der Wassergehalt in Col-0 und *dde2* leicht gesunken (88%) wohingegen die *lox6* Mutante nur noch 80% Wassergehalt aufweist. Nach 22 Tagen Trockenheit liegt der Wassergehalt mit 56% in der *lox6* Mutante deutlich unter denen von Col-0 und *dde2* (70% bzw. 80%). Dieses Ergebnis spiegelt sich ebenfalls bei der Ermittlung der Überlebensrate der Pflanzen nach Trockenheit wieder (Abbildung 4.21). Dazu wurden die Pflanzen vollständig welken gelassen, anschließend gewässert und die Überlebensrate 2 Tage nach der Wässerung ermittelt. Dabei liegt die Überlebensrate von Col-0 Pflanzen 48 Stunden nach Wässerung bei 78%. Die Überlebensrate von *lox6* ist mit 14% signifikant niedriger. Zwischen Col-0 und *dde2* gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensrate.

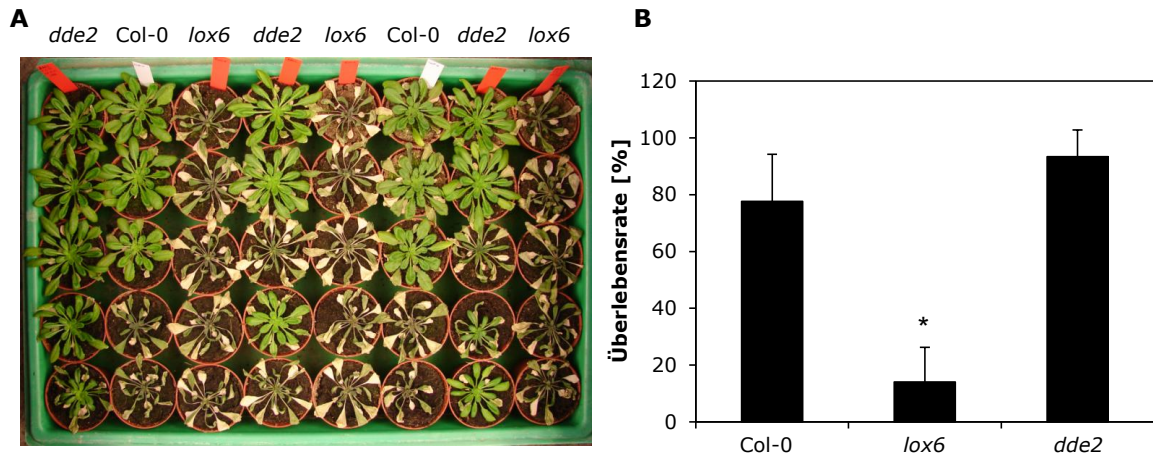


Abbildung 4.21 A: Abbildung von Col-0, *lox6* und *dde2* Pflanzen 48 Stunden nach Wässerung B: Überlebensrate von Col-0, *lox6* und *dde2* Pflanzen 48 Stunden nach Wässerung in %. Die Pflanzen wurden vollständig welken gelassen und anschließend gewässert. (MW+STABW aus drei Experimenten, n=29, * p<0,05, t-Test unabhängiger Stichproben)

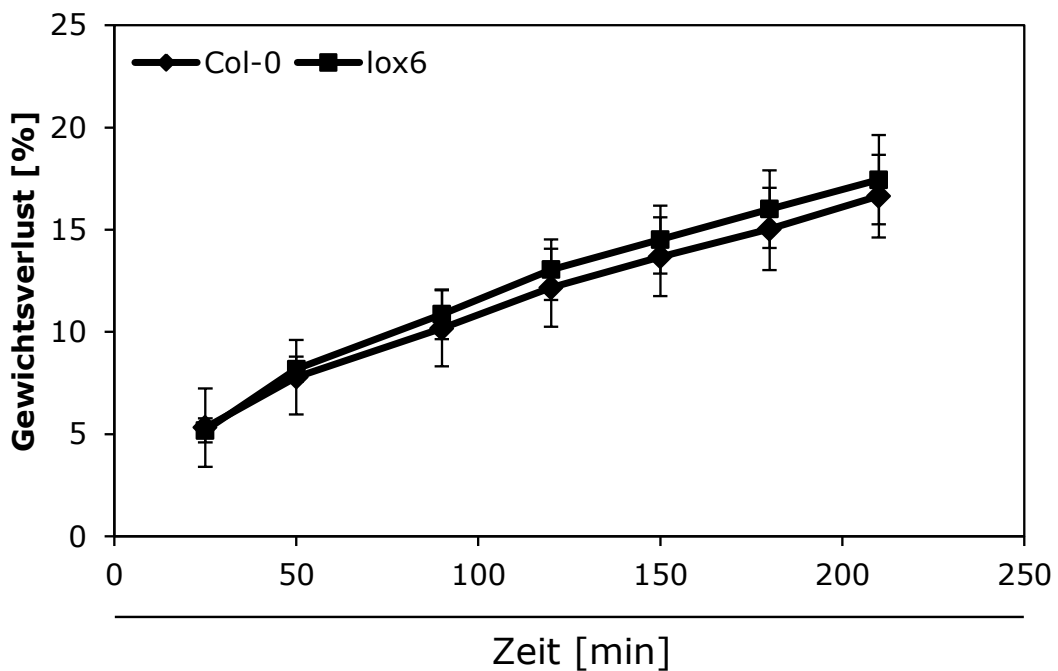


Abbildung 4.22 Gewichts/Wasserverlust von abgeschnittenen Col-0 und *lox6* Blättern in %. (MW±STABW, n=6)

Neben Untersuchungen zum Verhalten ganzer Pflanzen nach Trockenstress wurden zudem abgeschnittene Blätter von 6 Wochen alten hydroponisch angezogenen Col-0 und *lox6* Pflanzen hinsichtlich ihres Wasserverlusts untersucht (Abbildung 4.22). Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die an ganzen Pflanzen beobachteten Welke-Unterschiede durch Prozesse in der ganzen Pflanze bzw. Wurzel oder durch Effekte in den Blättern (wie Stomata-Schluss) reguliert werden. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen keinen Unterschied im Gewichts und damit Wasserverlust der

abgeschnittenen *lox6* Blätter im Vergleich zu Col-0. Bei beiden Pflanzenlinien kann über die Zeit eine gleichmäßige Abnahme des Gewichts von etwa 5% pro Stunde beobachtet werden.

4.3.2 Fütterung von *Porcellio scaber* mit Wildtyp und JA Biosynthesemutanten

Neben den Untersuchungen zu biologischen Funktion von Oxylipinen in der Wurzel bei Trockenstress wurden auch Versuche hinsichtlich der Abwehr der Wurzeln gegen saprobionte Fressfeinde unternommen. Es ist bekannt, dass Jasmonate wichtige Signalstoffe in der Abwehr gegen herbivore Fressfeinde und Pathogene darstellen (Wasternack and Hause, 2000). Zudem wurde in der Literatur bereits gezeigt, dass sowohl lebende, Jasmonat defiziente *Arabidopsis* Pflanzen, als auch deren frisch abgeschnittene Blätter, von Kellerasseln (*P. scaber*), welche normalerweise abgestorbenes Pflanzenmaterial fressen, gegenüber Wildtyp Pflanzen bevorzugt verzehrt werden (Farmer and Dubugnon, 2009). Da Kellerasseln auf und in den oberen Bodenschichten leben und so im direkten Kontakt zum Wurzelwerk von Pflanzen stehen, bietet dieses System eine gute Möglichkeit zu untersuchen, ob Jasmonate auch in der Wurzel das Fressverhalten dieser saprobiontisch lebenden Tiere beeinflussen.

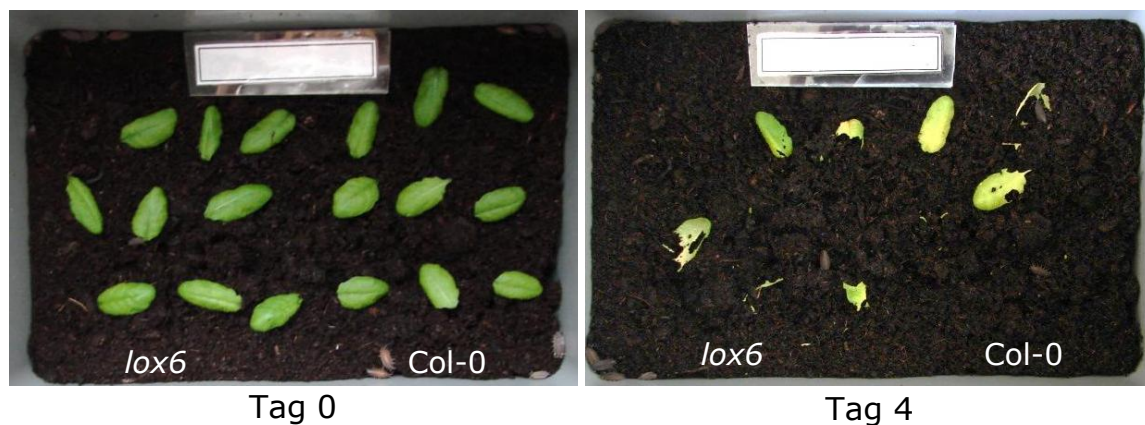


Abbildung 4.23 Fütterung von *P. scaber* mit Col-0 und *lox6* Blättern. Blätter von 6 Wochen alten Col-0 und *lox6* Pflanzen wurden den Kellerasseln als Futter gegeben und das Fressverhalten mit Fotos (0 und 4 Tage) dokumentiert.

Zunächst wurde das von Farmer und Dubugnon verwendete Testsystem mit abgeschnittenen Blättern des Wildtyps und der *dde2* Mutante, welche einen Defekt im selben Gen wie die bei Farmer und Dubugnon verwendete *aos* Mutante besitzt, getestet (Abbildung A.4). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die abgeschnittenen *dde2* Blätter von den Kellerasseln gegenüber Wildtyp Blättern bevorzugt gefressen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Farmer und Dubugnon überein.

Dasselbe System wurde anschließend für Blätter der *lox6* Mutante verwendet (Abbildung 4.23 und Abbildung 4.24). Diese Blätter besitzen, wie in den vorherigen, analytischen Untersuchungen gezeigt, basal sehr wenig OPDA, haben jedoch nach Stresseinwirkung ähnliche Jasmonat Spiegel wie der Wildtyp. Hierbei konnte kein Unterschied im Fressverhalten der Kellerrasseln zwischen Blättern der Mutante und des Wildtyps beobachtet werden. Innerhalb von 5 Tagen nimmt die relative Blattfläche vom Wildtyp und *lox6* gleichmäßig von 100% auf 0% (Col-0) bzw. 6% (*lox6*) ab.

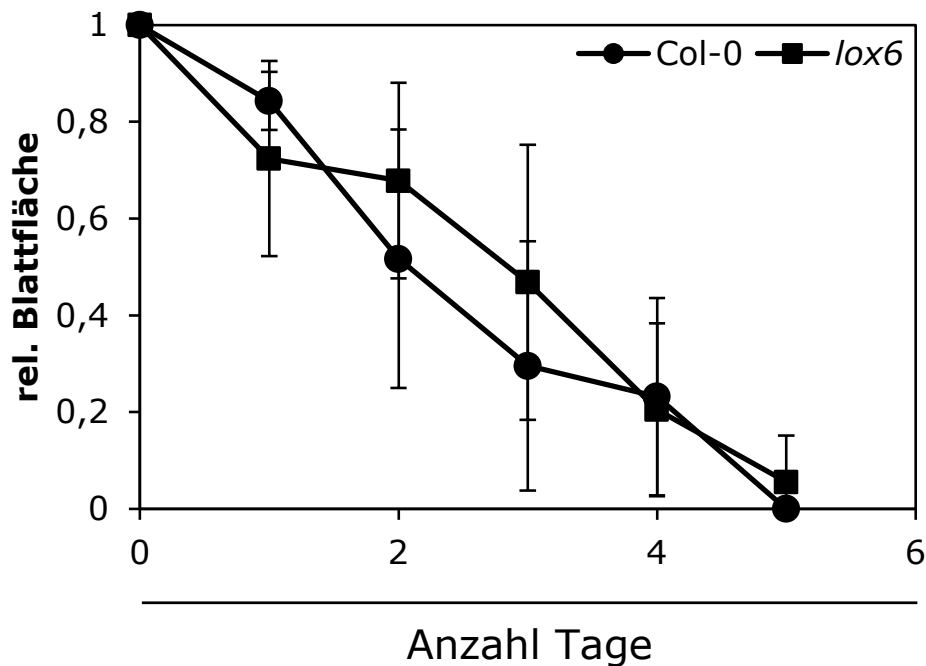


Abbildung 4.24 Fütterung von *P. scaber* mit Col-0 und *lox6* Blättern. Blätter von 6 Wochen alten Col-0 und *lox6* Pflanzen wurden den Kellerrasseln als Futter dargeboten und die relative Blattfläche (zu Beginn des Experiments = 1) über 5 Tage ermittelt. (MW±STABW, n=3)

Nach Untersuchung der Blätter wurde das verwendete System auf die Wurzeln von *Arabidopsis* Pflanzen ausgeweitet. Dazu wurden zunächst abgeschnittene Col-0 und *dde2* Wurzeln verwendet um zu untersuchen ob die an den Blättern beobachteten Unterschiede im Fressverhalten der Asseln auch bei den Wurzeln auftreten. Wie in Abbildung 4.25 dargestellt, werden, wie bei den Blättern, die Wurzeln der Jasmonat freien *dde2* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp bevorzugt gefressen. Das System wurde daher als geeignet angesehen um zu untersuchen ob auch Wurzeln der *lox6* Mutante, die weder basal noch nach Stresseinwirkung eine deutliche Bildung von OPDA, JA oder JA-Ile aufweisen, von den Asseln bevorzugt gefressen werden.



Abbildung 4.25 Fütterung von *P. scaber* mit Col-0 und *dde2* Wurzeln. Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0 und *dde2* Pflanzen wurden den Kellerasseln als Futter gegeben und das Fressverhalten mit Fotos (0, 1, 2 und 3 Tage) dokumentiert.



Abbildung 4.26 Fütterung von *P. scaber* mit Col-0 und *lox6* Wurzeln. Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0 und *lox6* Pflanzen wurden den Kellerasseln als Futter gegeben und das Fressverhalten mit Fotos (0 und 8 Tage) dokumentiert.

Abbildung 4.26 zeigt deutlich, dass nach 8 Tagen mehr des *lox6* Wurzelmaterials als des Wildtypmaterials gefressen wurde. Bei genauerer Quantifizierung (Abbildung 4.27) ist ersichtlich, dass die die relative Wurzelfläche von Col-0 und *lox6* in den ersten 3 Tagen gleichmäßig von 100% auf 70% abnimmt. Ab dem 4. Tag reduziert sich die Fläche der *lox6* Wurzeln schneller als die der Col-0 Wurzeln. Nach 8 Tagen sind bei *lox6* nur noch 5% der ursprünglichen Wurzelfläche vorhanden, während es beim Wildtyp noch 36% sind.

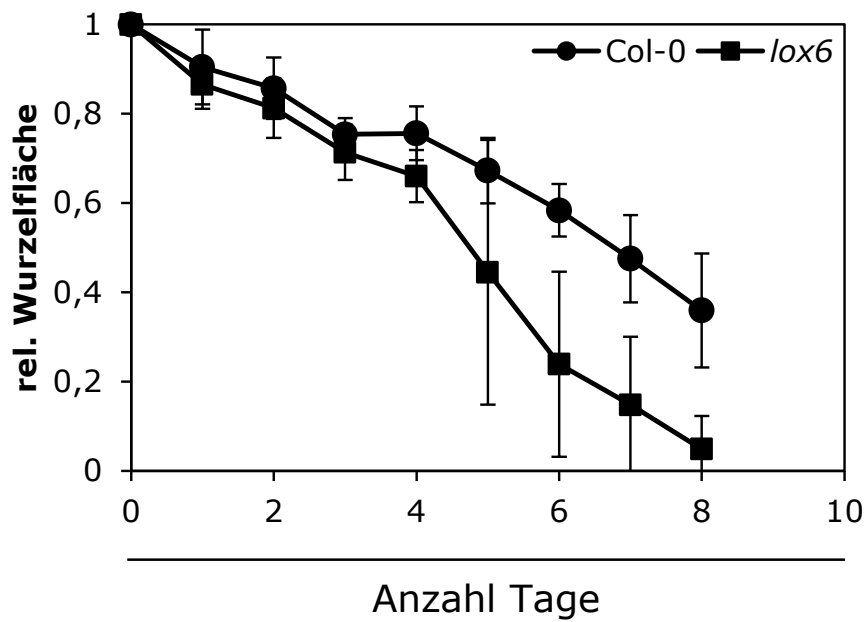


Abbildung 4.27 Fütterung von *P. scaber* mit Col-0 und *lox6* Wurzeln. Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0 und *lox6* Pflanzen wurden den Kellerasseln als Futter dargeboten und die relative Wurzelfläche (zu Beginn des Experiments = 1) über 8 Tage ermittelt. (MW±STABW, n=3, * p<0,05, t-Test unabhängiger Stichproben)

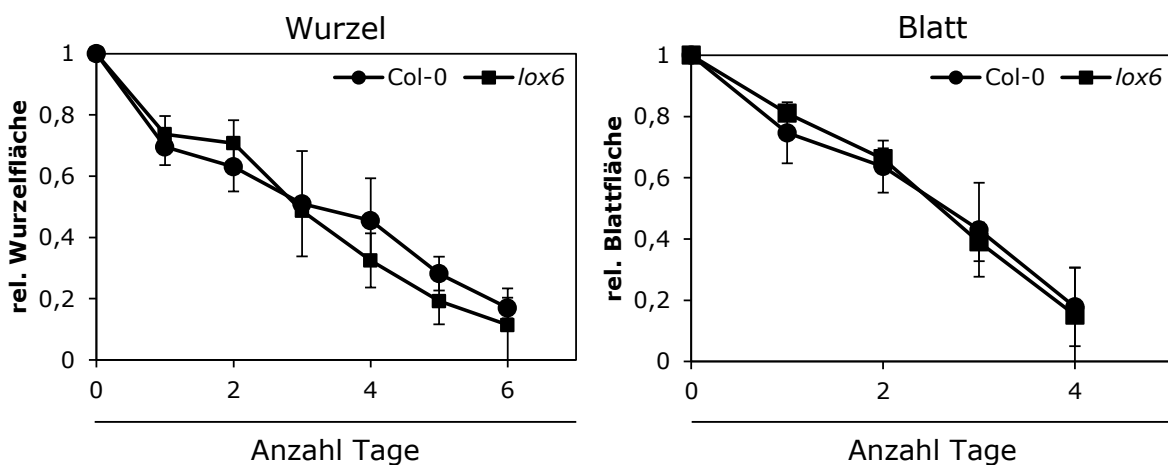


Abbildung 4.28 Fütterung von *P. scaber* mit zuvor schockgefrorenen Col-0 und *lox6* Blättern bzw. Wurzeln. Blätter und Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0 und *lox6* Pflanzen wurden getrennt gefroren und anschließend den Kellerasseln als Futter dargeboten und die relative Wurzel- bzw. Blattfläche (zu Beginn des Experiments = 1) über 6 bzw. 4 Tage ermittelt. (MW±STABW, n=3)

Um zu ermitteln, ob die *lox6* Mutante bereits im basalen Zustand bevorzugt von den Asseln gefressen wird und ob die Jasmonatspiegel an diesem Effekt beteiligt sind, wurde neben den frischen Blättern und Wurzeln auch schockgefrorenes Material verwendet. Dieses wurde frisch abgeschnitten und direkt gefroren, um die basalen Jasmonatspiegel zu erhalten. Wie in Abbildung 4.28 zu erkennen ist, gibt es bei Wildtyp und *lox6* Wurzeln und Blättern, deren basale Jasmonatspiegel durch Schockgefrieren konstant gehalten wurden, keine Unterschiede im Fressverhalten von *P. scaber*. Sowohl bei Wurzeln als auch bei Blättern ist nach 6 bzw. 4 Tagen der größte Teil des dargebotenen Pflanzenmaterials der Col-0 und *lox6* Pflanzen aufgefressen.

Da es, wie zuvor gezeigt, keine Unterschiede im Fressverhalten der Asseln bezüglich der Blatt- bzw. Wurzelflächen von gefrorenem Wildtyp und *lox6* Pflanzenmaterial gab, jedoch Unterschiede bei frischem Material zu verzeichnen waren, wurde weiterhin untersucht ob die Asseln einen Anstieg von Jasmonaten in frischem Blatt- und Wurzelmaterial induzieren. Dazu wurden die Jasmonatspiegel der verschiedenen Pflanzenorgane basal sowie 7 Tage (Wurzel) oder 4 Tage (Blätter) nach Behandlung mit *P. scaber* analysiert. Als Kontrolle wurden jeweils abgeschnittene Wurzeln bzw. Blätter analysiert, welche die entsprechende Anzahl Tage ohne Asseln auf Erde lagen. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 4.29 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass in der Wurzel im Wildtyp sowohl in der Kontrolle als auch in den Assel Proben die OPDA-Spiegel von 2,7 nmol g⁻¹ TG auf 0,1 bzw. 0,2 nmol g⁻¹ TG absinken. Ein ähnlicher Effekt ist auch für JA im Wildtyp erkennbar. Hier sinken die JA-Spiegel von 0,3 nmol g⁻¹ TG auf 0,01 bzw. 0,1 nmol g⁻¹ TG ab. Insgesamt fällt jedoch auf, dass die Gehalte von OPDA und besonders JA in den Assel-Proben höher als in den Kontroll-Proben sind. JA-Ile liegt basal an der Nachweisgrenze und zeigt weder nach Assel Behandlung noch in der Kontrolle eine deutliche Änderung. In der *lox6* Mutante ist im Vergleich zu den basalen Spiegeln ebenfalls eine leichte Abnahme der OPDA und JA-Gehalte der Kontrolle im Vergleich zur Assel Behandlung erkennbar. Hier sind die basalen OPDA und JA-Spiegel mit jeweils 0,1 nmol g⁻¹ TG jedoch bereits, wie aus den vorherigen Jasmonat-Analysen dieser Mutante erwartet, sehr gering und liegen an der Nachweisgrenze. In den Blättern ist basal im Wildtyp etwa 5,0 nmol g⁻¹ TG OPDA vorhanden, in der Mutante ist, wie erwartet, basal nahezu kein OPDA detektierbar. Bei der Kontrolle und nach Assel-Behandlung liegen die OPDA-Gehalte in Wildtyp und Mutante mit 0,5 zu 1,7 und 0,4 zu 1,0 nmol g⁻¹ TG auf einem ähnlichen Niveau und zeigen jeweils, im Vergleich zur Kontrolle, nach Assel-Behandlung einen leicht höheren OPDA-Gehalt. JA und JA-Ile sind sowohl im Wildtyp, als auch in der *lox6* Mutante basal nicht detektierbar. In der Kontrolle und nach Assel-Fraß zeigen sich jeweils leicht erhöhte JA und auch JA-Ile Spiegel, diese zeigen jedoch weder zwischen der Kontrolle und der Behandlung, noch zwischen Wildtyp und Mutante deutliche Unterschiede.

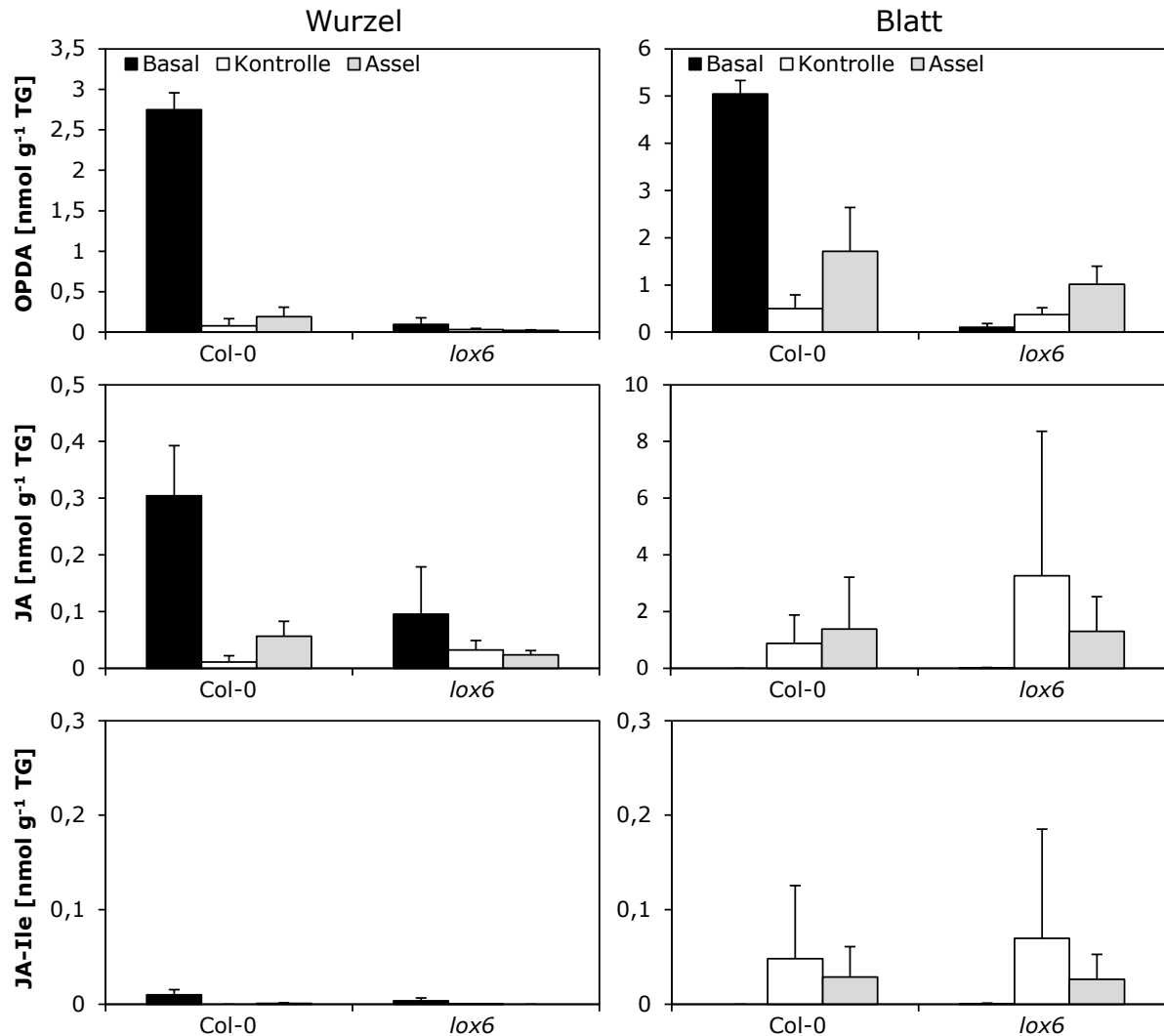


Abbildung 4.29 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp und *lox6* Pflanzen nach Behandlung mit *P. scaber*. Abgeschnittene Wurzeln bzw. Blätter wurden *P. scaber* als Futter zu Verfügung gestellt und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile basal und nach 7 Tagen (Wurzel) bzw. 4 Tagen (Blatt) analysiert. Als Kontrolle wurden abgeschnittene Wurzeln und Blätter für den entsprechenden Zeitraum ohne *P. scaber* behandelt. (MW+STABW, n= 3)

Um weitere Hinweise zu erhalten, ob Jasmonate als Signalstoffe am Fressverhalten von Asseln beteiligt sind, wurden Sprosse und Wurzeln von Wildtyp und *lox6* Pflanzen getrennt verwundet, nach 0,5 Stunden schockgefroren und anschließend den Asseln als Futter angeboten (Abbildung 4.30). So wurden hohe Jasmonatspiegel in Wildtyp Wurzeln und Blättern und *lox6* Blättern erreicht (vgl. Abbildung 4.10). Wie bei den vorherigen Versuchen mit frischem Blattmaterial konnte ebenfalls kein Unterschied im Fressverhalten von *P. scaber* zwischen verwundeten und anschließend gefrorenen Wildtyp und *lox6* Blättern festgestellt werden. Jedoch war, anders als bei frischem Material, auch bei den verwundeten und gefrorenen Wurzeln kein Unterschied zwischen Wildtyp und *lox6* Mutante zu verzeichnen.

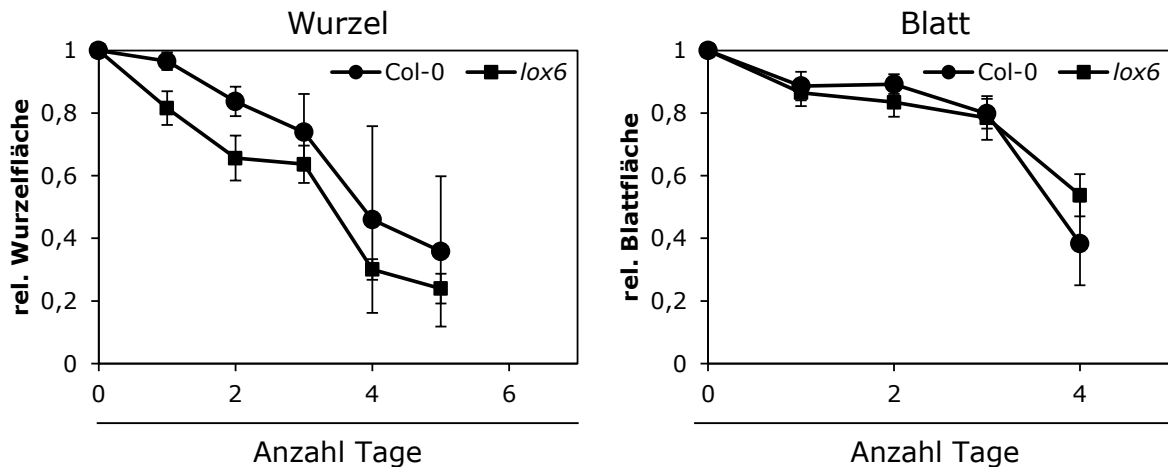


Abbildung 4.30 Fütterung von *P. scaber* mit verwundeten und schockgefrorenen Col-0 und *lox6* Blättern bzw. Wurzeln. Blätter und Wurzeln von 6 Wochen alten Col-0 und *lox6* Pflanzen wurden getrennt verwundet, nach 0,5 Stunden schockgefroren und anschließend den Kellerasseln als Futter dargeboten. Die relative Wurzel- bzw. Blattfläche (zu Beginn des Experiments = 1) wurde über 5 bzw. 4 Tage ermittelt. (MW±STABW, n=3)

4.4 Vorcharakterisierung von *LOX2* und *6* Überexpressionslinien

Die zuvor gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass es in der Wurzel von *Arabidopsis* Pflanzen eine vom Spross unabhängige Produktion von Jasmonaten unter verschiedenen Stressbedingungen gibt. Zudem konnte anhand verschiedener LOX-Mutanten gezeigt werden, dass in der Wurzel besonders die LOX6 eine wichtige Rolle in der Jasmonatproduktion spielt. Im Vergleich dazu ist bekannt, dass in den Blättern von *Arabidopsis* Pflanzen die LOX2 eine wichtige Rolle in der Jasmonatproduktion nach Stress einnimmt (Bell et al., 1995; Seltmann et al., 2010). Um in Zukunft untersuchen zu können, ob unter bestimmten Umständen auch eine andere LOX in den Wurzeln zur Bildung von Jasmonaten beitragen kann wurden mit Hilfe des Gateway™[®]-Systems *LOX2* Überexpressionslinien hergestellt. Zudem wurden auch *LOX6* Überexpressionslinien hergestellt. Diese können dazu verwendet werden zu vergleichen ob die beobachteten Phänotypen der *lox6* KO Mutante hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Trockenheit und Saprobiten-Fraß in einer Überexpressionsmutante zur vermehrten Resistenz gegen diese Stresse führt.

4.4.1 *LOX* Expression und Proteinnachweis in 35S::HA::*LOX2* Linien

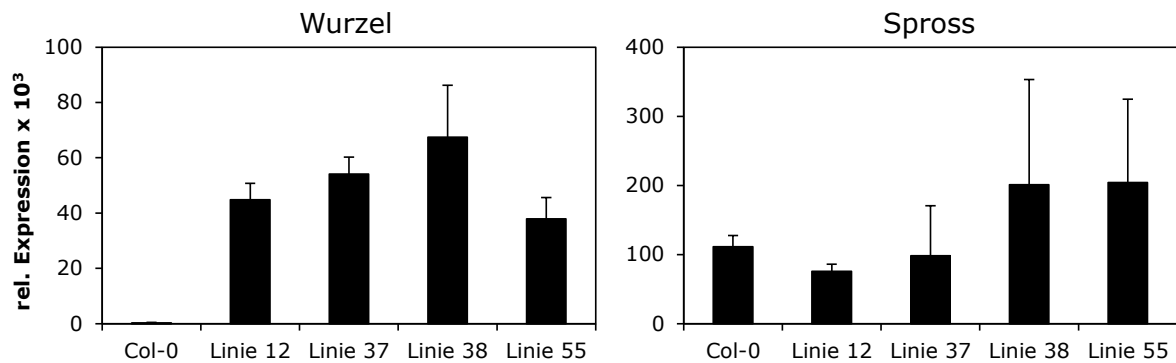


Abbildung 4.31 Relative *LOX2* Expression in Wurzel und Spross von Wildtyp Pflanzen und vier verschiedenen 35S::HA::*LOX2* Linien (T3 Generation). Spross und Wurzel wurden getrennt und die relative Genexpression mittels qRT-PCR analysiert. (MW+STABW, n= 3)

In Abbildung 4.31 ist die relative Genexpression des *LOX2* Gens in Spross und Wurzel des Wildtyps und vier verschiedenen, homozygoten 35S::HA::*LOX2* Linien dargestellt. Dabei zeigt sich, wie aus der Literatur und vorherigen Untersuchungen erwartet, in der Wildtyp Wurzel nur geringe Expression des *LOX2* Gens (240 Transkripte) (siehe Abbildung 4.9) (Hruz et al., 2008), wohingegen in allen vier Überexpressionslinien stark erhöhte Transkriptmengen vorhanden sind. Die stärkste Expression ist in Linie 38 (67000 Transkripte) zu verzeichnen. Die schwächste Expression zeigt Linie 55 mit 38000 Transkripten. Im Blatt ist die *LOX2* Expression im Wildtyp mit 111000 Transkripten sehr viel höher als in der Wurzel. In den Überexpressionslinien 12 und 37 ist keine verstärkte Expression des *LOX2* Gens detektierbar, hier sind die Werte mit 76000 bzw. 98000 Transkripten sogar etwas niedriger. In Linie 38 und 55 hingegen können gegenüber dem Wildtyp erhöhte Transkriptmengen (201000 bzw. 204000 Transkripte) verzeichnet werden. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Proteindetektion wieder (Abbildung 4.32). Hier konnte mit HA-spezifischen Antikörpern in einem Western-Blot in der Wurzel in allen vier Überexpressionslinien das HA-*LOX2* Protein mit einer Größe von etwa 106 kDa nachgewiesen werden. Im Spross war dieser Nachweis nur in Linie 38 und Linie 55 möglich. Dies sind dieselben Linien, welche auch eine erhöhte *LOX2* Expression im Spross gezeigt haben.

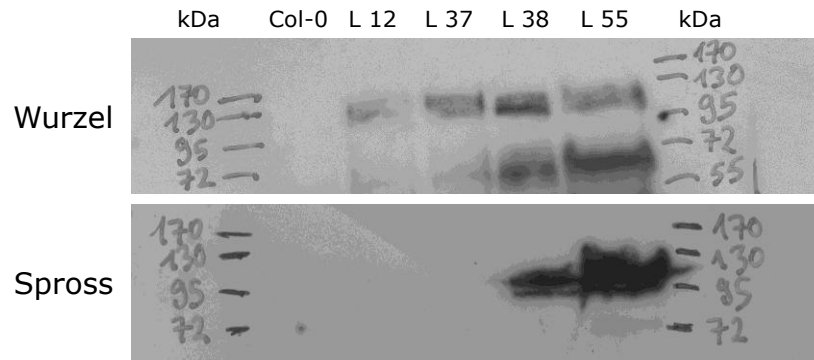


Abbildung 4.32 Western-Blot Analyse von Proteinextrakten aus Wurzel und Spross von Wildtyp Pflanzen und vier verschiedenen, homozygoten 35S::HA::LOX2 Linien. Nachweis von HA-LOX2 Protein mittel HA-spezifischer Antikörper.

4.4.2 LOX Expression in 35S::HA::LOX6 Linien

In Abbildung 4.33 ist die relative Expression des *LOX6* Gens in Blättern verschiedener 35S::HA::LOX6 Linien in der Parental Generation (P Generation) und des Col-0 Wildtyps dargestellt. Wie aus der Literatur und vorherigen Experimenten erwartet (Abbildung 4.9) (Hruz et al., 2008) ist im Wildtyp Blatt die Expression mit 800 Transkripten sehr gering. In einigen der stabil transformierten 35S::HA::LOX6 Linien (Linie 12, 22, 23 und 26) zeigt sich eine unterschiedlich stark erhöhte Transkriptmenge. Sie liegt zwischen 2000 (Linie 26) und 27000 Transkripten (Linie 22).

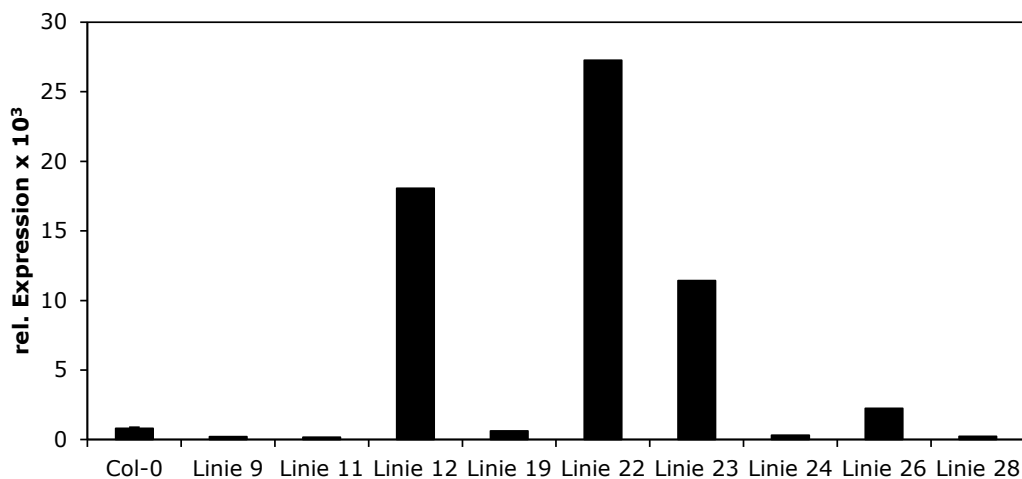


Abbildung 4.33 Relative *LOX6* Expression in Blättern von Wildtyp Pflanzen und verschiedener 35S::HA::LOX6 Linien (P Generation). Die relative Genexpression wurde mittels qRT-PCR analysiert. (Col-0: MW+STABW, n=2; 35S::HA::LOX6: MW, n=1)

5 Diskussion

5.1 Das Galaktolipid- und Oxylinprofil von Wurzel und Spross in *Arabidopsis* ist unterschiedlich

Es ist bekannt, dass die Expression verschiedener Oxylin-Biosynthese-Gene in *Arabidopsis thaliana* Sprossen und Wurzeln deutliche Unterschiede aufweist. So werden einige der JA-Biosynthese-Gene (z.B. die *13-LOX* Gene oder das *AOS*-Gen) besonders im Blatt exprimiert, wohingegen z.B. *9-LOX* Gene eine höhere Expression in der Wurzel aufweisen (Hruz et al., 2008). Um zu untersuchen, ob sich diese Expressionsunterschiede auch in den Gehalten verschiedener Oxyline und Galaktolipide in Spross und Wurzel widerspiegeln, wurden diese in Sprossen und Wurzeln sechs Wochen alter *Arabidopsis* Pflanzen analysiert. Es ist bekannt, dass Verwundung in Pflanzen einen starken Einfluss auf die Bildung von Oxylinen, insbesondere von Jasmonaten, hat. (Creelman et al., 1992; Bell et al., 1995; Vollenweider et al., 2000). Daher wurde für die ersten Versuche ein Verwundungsstress gewählt. Um während der Verwundungszeit einen Austausch von Oxylinen zwischen Spross und Wurzel zu vermeiden, wurden diese bereits vor der Verwundung getrennt. Zur leichteren Untersuchung und Behandlung der Wurzeln, wurden die verwendeten *Arabidopsis* Pflanzen in einem hydroponischen Anzuchtssystem kultiviert. Bei vielen der in der Literatur beschriebenen hydroponischen Systeme zur Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen sind aufwendige Belüftungsmaßnahmen nötig oder die Wurzeln der Pflanzen sind dem Licht ausgesetzt (Huttner and Bar-Zvi, 2003; Schlesier et al., 2003). Wurzeln besitzen jedoch, ebenso wie die oberirdischen Pflanzenorgane, verschiedene Photorezeptoren und es wurde bereits beschrieben, dass Licht einen Einfluss auf verschiedene Prozesse der Wurzelentwicklung wie Phototropie, die Wurzelhaarbildung, das Ergrünen der Wurzeln oder die Sensitivität der Wurzeln gegenüber Jasmonaten haben kann (De Simone et al., 2000; Sakai et al., 2000; Toth et al., 2001; Costigan et al., 2011). Um einen möglichen Einfluss von Licht auf die Bildung von Oxylinen in der Wurzel auszuschließen, wurde ein von Tocquin et al., 2003 beschriebenes System verwendet, welches die hydroponische Anzucht von Pflanzen in relativ kleinen Volumina Flüssigmedium erlaubt, das keine Belüftung benötigt und bei dem sich die Wurzeln in einer lichtundurchlässigen Kiste und somit im Dunkeln befinden. Da die Pflanzen bis zum ausgewachsenem Stadium (mehr als 6 Wochen) in diesem System kultiviert werden können, war es möglich, schnell und stressfrei genügend Wurzelmaterial für die Analyse von Galaktolipiden und verschiedenen Oxylinen, basal und nach unterschiedlichen Behandlungen, zu erhalten und dieses mit dem Spross derselben Pflanzen zu vergleichen.

Die Analyse der abundantesten Spezies der nicht oxidierten Galaktolipide zeigt im Spross, wie aus der Literatur erwartet, sehr hohe MGDG-Gehalte und geringere DGDG-Spiegel. So machen in Spinatchloroplasten die MGDG 52% und die DGDG 26% der gesamten Glycerolipide der Thylakoidmembran aus (Block et al., 1983; Ibrahim et al., 2011). In der Wurzel sind ebenfalls nicht oxidierte Galaktolipide detektierbar. Diese zeigen jedoch deutlich geringere Spiegel, was damit zusammenhängen kann, dass Galaktolipide den Hauptbestandteil von Plastidenmembranen ausmachen, wohingegen die nicht plastidären Membranen der pflanzlichen Zellen höhere Spiegel an Phospholipiden aufweisen (Kobayashi et al., 2009). Da Wurzeln insgesamt weniger Plastiden besitzen als die Blätter (Isono et al., 1997), ist es naheliegend, dass auch die Spiegel der Galaktolipide im Vergleich zum Spross verringert sind. Jedoch konnte besonders die Expression des *AtMGD3* Gens, welches an der Biosynthese von MGDGs in *Arabidopsis* beteiligt ist, auch in Wurzeln nachgewiesen werden (Awai et al., 2001; Kobayashi et al., 2004). Dies erklärt, warum besonders MGDG in den Wurzeln detektierbar war, DGDG jedoch nur in geringeren Mengen. Auch in den nicht photosynthetisch aktiven Chromoplasten von Narzissen und Paprika konnten größere Mengen von Galaktolipiden detektiert werden (Kleinig and Liedvogel, 1978; Camara et al., 1983). Dies zeigt, dass Galaktolipide, denen eine besondere Rolle während der Photosynthese zugeschrieben wird, auch in nicht photosynthetisch aktiven Plastiden vorkommen.

Galaktolipide können in *Arabidopsis* jedoch nicht nur mit nicht-oxidierten Fettsäuren gekoppelt vorliegen, sondern auch, wie bereits in der Einleitung erwähnt, verestert mit OPDA oder dnOPDA. In dieser Arbeit konnten die Arabidopside A, B, D und E besonders in Blättern nach Verwundung in größeren Mengen (μmol Bereich) nachgewiesen werden, wohingegen in der Wurzel lediglich Arabidopsid B nach Verwundung in sehr geringen Mengen (nmol Bereich) detektierbar war (Abbildung 4.3). Ein Anstieg der Arabidopsid-Gehalte in Blättern nach Verwundung, wie er in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist auch bereits aus der Literatur bekannt (Buseman et al., 2006; Bottcher and Weiler, 2007; Kourtchenko et al., 2007; Glauser et al., 2008; Nilsson et al., 2012). Arabidopside werden als mögliche Speicherform zur schnellen Freisetzung von OPDA und dnOPDA nach Stresseinwirkung postuliert (Kourtchenko et al., 2007; Bottcher and Pollmann, 2009; Stingl, 2011). Es gibt jedoch auch Studien, die darauf hindeuten, dass nur freie OPDA als Pool für die JA und JA-Ile Produktion dient (Glauser et al., 2009; Koo et al., 2009). Bezüglich Arabidopsiden in der Wurzel ist bisher sehr wenig bekannt. Es wurde lediglich gezeigt, dass die Arabidopside A, B und D eine hemmende Wirkung auf das Wurzelwachstum von Kresse haben (Hisamatsu et al., 2005). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Wurzel keine Arabidopside vorkommen. Da Wurzeln, welche unter Lichtausschluss gewachsen sind, keine

funktionsfähigen Chloroplasten besitzen, unterstützt dieses Ergebnis die bereits erwähnte These von Böttcher und Weiler, dass Arabidopside hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich, in den Thylakoidmembranen von Chloroplasten vorkommen (Böttcher and Weiler, 2007).

Eine weitere Gruppe von Oxylipinen, welche in Blättern bereits häufig untersucht wurde, deren Verteilung und Gehalte in der Wurzel jedoch weitestgehend unbekannt sind, sind Hydroxy-Oktadekatriensäuren (HOTE). Abhängig von der Position ihrer Hydroxylgruppe können HOTE enzymatisch oder auch nicht-enzymatisch gebildet werden. Es ist bekannt, dass die Expression der *LOX* Gene, welche an der Bildung von 9- und 13-HOTE beteiligt sind, starke Unterschiede in Spross und Wurzel zeigen (Hruz et al., 2008). So sind in *Arabidopsis* die *9-LOX* Gene vorwiegend in der Wurzel exprimiert, wohingegen die *13-LOX* Gene stärker im Spross exprimiert werden. Betrachtet man die Gehalte von 9- und 13-HOTE in Spross und Wurzel im Vergleich zur Expression der entsprechenden *LOX* Gene, ist interessant, dass sich trotz der starken Expressionsunterschiede basal keine deutlichen Unterschiede in den Fettsäure-Gehalten zeigen (Abbildung 4.4). Es sind jeweils beide Fettsäuren in gleichem Maße detektierbar. Nach Verwundung gibt es im Spross jedoch einen stärkeren Anstieg an 13-HOTE, in der Wurzel hingegen wird vermehrt 9-HOTE gebildet. Dies korreliert mit den Erwartungen der Genexpressionsdaten. Da jedoch, wie bereits beschrieben, trotz der geringen *13-LOX* Expression deutliche Spiegel an 13-HOTE in der Wurzel sowohl basal als auch nach Verwundung detektierbar sind, zeigt dies, dass die Gehalte der Oxylipine nicht zwingend mit der beobachteten Genexpression korrelieren müssen. Nach Verwundung konnte in der Wurzel für die ebenfalls durch *13-LOX* Enzyme gebildeten Jasmonate JA und JA-Ile eine deutliche Zunahme beobachtet werden (Abbildung 4.1). Dieser Aspekt der Arbeit soll im folgenden Kapitel genauer erläutert werden.

5.2 Jasmonatproduktion in Wurzeln von *Arabidopsis*

Die Bildung von Jasmonaten ist in Blättern von *Arabidopsis* bereits sehr gut untersucht. Da die Biosynthese jedoch in den Plastiden stattfindet und, wie bereits erwähnt, die Expression verschiedener JA-Biosynthese-Gene in der Wurzel sehr gering ist, wurde die Jasmonatproduktion in der Wurzel bis auf einige wenige Studien bisher nicht sehr ausführlich untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Jasmonate nach unterschiedlicher Stresseinwirkung in der Wurzel von *Arabidopsis* tatsächlich gebildet werden können. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass diese Bildung unabhängig vom Spross stattfindet und dass die *LOX6* als einzige der vier in *Arabidopsis* bekannten *13-LOX* Enzyme an der Jasmonat-Biosynthese in der Wurzel beteiligt ist. Weiterhin wurde untersucht, welche Funktion Jasmonate bzw. andere durch *13-LOX* Enzyme

gebildete Oxylipine in der Wurzel haben. Dabei konnte gezeigt werden, dass es eine Beteiligung von 13-LOX Produkten an der Resistenz von *Arabidopsis* Pflanzen gegen Trockenheit gibt. Zudem gibt es Hinweise, dass Jasmonate in der Wurzel an der Regulation des Fressverhaltens von saprobionten Kletterasseln beteiligt sind.

5.2.1 Jasmonate werden in der Wurzel unabhängig vom Spross gebildet

Es ist bekannt, dass verschiedene Stresse, wie Verwundung, osmotischer Stress oder Pathogen-Befall, in Blättern von *Arabidopsis* einen deutlichen Anstieg von Jasmonaten auslöst (Bell et al., 1995; Glauser et al., 2009; Koo et al., 2009; Seltmann et al., 2010). Auch in Wurzeln von *Arabidopsis* konnten bereits geringe Mengen von JA und JA-Ile nachgewiesen werden (Suza and Staswick, 2008; Hasegawa et al., 2011). In Schneckenklee (*Medicago truncatula*) wurde gezeigt, dass nach mechanischer Verwundung der Wurzel der Gehalt an JA in Wurzel und Spross ansteigt (Tretner et al., 2008). Auch in Tomate konnte ein Anstieg von JA in Wurzeln und Blättern nach Salzstress beobachtet werden (Ghanem et al., 2012). Für *Arabidopsis* war allerdings bisher nicht bekannt, ob Wurzeln, wie bereits in Blättern gezeigt, in der Lage sind, Jasmonate nach Stress selbst zu bilden. Deshalb wurden in dieser Arbeit Verwundungskinetiken mit getrennt verwundeten Wurzeln und Sprossen von hydroponisch kultivierten *Arabidopsis* Pflanzen durchgeführt (Abbildung 4.1). Hierbei zeigt der Spross den erwarteten Jasmonat-Anstieg. Für die Wurzel konnte ebenfalls ein Anstieg von JA und JA-Ile 0,5 Stunden nach Verwundung verzeichnet werden. Da die Wurzel zum Zeitpunkt der Verwundung keinen Kontakt mehr zum Spross hatte, gibt dies einen ersten Hinweis darauf, dass die Wurzel selbständig Jasmonate nach Verwundung bilden kann. Jedoch nahm der basale Gehalt von OPDA in diesem Gewebe ebenfalls bereits nach 0,5 Stunden dramatisch ab. Um zu untersuchen, ob die Wurzel selbst OPDA bilden kann oder ob die basalen Spiegel in der Wurzel durch Transport von OPDA vom Spross in die Wurzel aufgebaut werden, wurden Pfropfungs-Experimente durchgeführt. Dazu wurden Pfropf-Bastarde mit Sprossen der Jasmonat-defizienten *dde2* Mutante und Col-0 Wurzeln, sowie umgekehrt, und Wildtyp/Wildtyp Kontrollen hergestellt. In allen Pfropfkombinationen verhielt sich das jeweilige Wildtyporgan wie ein nicht gepfropfter Wildtyp bzw. wie die gepfropfte Wildtypkontrolle (Abbildung 4.6, Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8). In den *dde2* Organen konnten jeweils keine bzw. nur sehr geringe Jasmonatgehalte ermittelt werden. Dies zeigt, dass es keinen direkten Transport von OPDA oder anderen Jasmonaten zwischen Spross und Wurzel zu geben scheint und dass die Wurzeln selbständig Jasmonate bilden können.

Verwundungsexperimente mit Wurzeln an intakten Wildtyp Pflanzen (Abbildung 4.5) zeigten in der Wurzel sowie im Spross eine Abnahme der OPDA-Spiegel, wohingegen

die Gehalte an JA und JA-Ile im Spross, sowie in geringerem Maße in der Wurzel, anstiegen. Bei Verwundung des Sprosses einer intakten Pflanze zeigte sich in der Wurzel nach 0,5 Stunden ebenfalls der Rückgang von OPDA, es war jedoch kein JA oder JA-Ile Anstieg zu verzeichnen. Im Spross hingegen nahmen alle gemessenen Jasmonate, wie aus anderen Studien mit verwundeten Blättern bereits bekannt und erwartet, deutlich zu. Da durch die zuvor vorgestellten Pfropfungsversuche ein Transport von Jasmonaten als eher unwahrscheinlich anzusehen ist, ist anzunehmen, dass die Änderungen der Jasmonat Spiegel in den jeweils nicht verwundeten Organen durch andere Signalprozesse vermittelt werden, welche die Neubildung von Jasmonaten beeinflussen können. Eine Beteiligung von Jasmonaten in der „root to shoot“ Kommunikation von Pflanzen wird auch in der Literatur immer wieder diskutiert. So stellt sich unter anderem die Frage, ob die Bildung von Jasmonaten in einem Pflanzenorgan, z.B. in Blättern, über Signale die Bildung von Jasmonaten in einem anderen Organ, z.B. in Wurzeln, auslösen kann. Was diese Signale sind, ist bisher nicht genau bekannt. Für Tomate wurde die Beteiligung von Systemin, einem Peptidsignal, an der systemischen Signalweiterleitung nach Verwundung postuliert (Schilmiller and Howe, 2005). Dabei handelt es sich zwar nicht um ein Signal zwischen Blatt und Wurzel, zeigt jedoch, dass z.B. Peptide eine Signal-Funktion übernehmen können. Die Idee, dass die Jasmonatproduktion in systemischen Geweben durch die Weiterleitung von Signalen angeregt wird, wird dadurch bekräftigt, dass auch Hasegawa et. al., 2011 0,5 Stunden nach Verwundung der Wurzel von *Arabidopsis* Keimlingen einen Anstieg von JA im Spross beobachten konnte. Zudem wurde in dieser Arbeit die Zunahme der Expression sehr vieler Wurzel zu Spross responsiver (*RtS*)-Gene, darunter auch einige JA Biosynthese-Gene (*LOX2*, *OPR3*, *AOS*) gezeigt. Als *RtS*-Gene wurden solche Gene klassifiziert, welche nach Verwundung der Wurzel eine veränderte Expression im Spross aufweisen. In der JA-defizienten *fad3/7/8* Mutante konnte hingegen eine deutliche Reduktion der Expression der *RtS*-Gene verzeichnet werden. Dies weist tatsächlich auf Jasmonate als beteiligte Faktoren der Regulation hin. Im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit war bei Hasegawa et. al., 2011 0,5 Stunden nach Verwundung der Wurzel keine Abnahme der OPDA-Spiegel im Spross zu verzeichnen, sondern nach 6 Stunden sogar ein Anstieg. Diese Unterschiede können damit zusammenhängen, dass zum einen anstatt ausgewachsener Pflanzen Keimlinge und zum anderen ein anderes Verwundungssystem verwendet wurde. Es wurden nicht alle Wurzeln gequetscht, sondern nur die Hauptwurzel des Keimlings abgeschnitten. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten, radikaleren Verwundungssystem könnten mögliche Signaltransportwege über das Leitgewebe der Wurzeln zum Spross zerstört worden sein. Es ist jedoch auch möglich, dass die unterschiedlichen Verwundungsreize (glatter Schnitt gegen Quetschung) verschiedene Signalantworten in der Pflanze auslösen.

Dass die Effekte und Regulationen der „root to shoot“ Kommunikation und von Abwehrstrategien sehr komplexe Vorgänge sind, welche abhängig vom Stresstimulus in verschiedenen Pflanzen-Arten unterschiedlich organisiert werden, verdeutlichen auch folgende Ergebnisse. So wurde gezeigt, dass ein JA-Anstieg durch Verwundung oder Herbivorie in Tabakblättern bei diesen Pflanzen zu reduziertem Wurzelwachstum führt (Hummel et al., 2007; Hummel et al., 2009). Dieser Effekt konnte jedoch in *Arabidopsis* nicht nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2010). In anderen Pflanzenarten konnten auch noch weitere Auswirkungen der JA-vermittelten Kommunikation zwischen dem Spross und der Wurzel gezeigt werden. So führt die Behandlung von Pappelblättern mit JA oder die Behandlung von Tabakblättern mit dem Haupt-Elicitor des oralen Sekrets von Tabakschwärmer Raupen (*Manduca sexta*), welcher JA-Akkumulation in Blättern auslöst, zu einer besseren der Versorgung der Wurzeln mit Fotoassimilaten (Babst et al., 2005; Schwachtje et al., 2006). Auch hier muss also eine Form des Signalaustauschs zwischen Spross und Wurzel stattfinden, damit es zur Umlagerung der Versorgung von Blättern und Wurzeln kommen kann.

5.2.2 Beteiligung von 13-Lipoxygenasen an der Bildung von Jasmonaten nach verschiedenen Stressen.

Die Untersuchung verschiedener 13-LOX-Mutanten nach unterschiedlichen Stressen zeigt, dass unterschiedliche 13-LOX Enzyme an der Bildung von Jasmonaten in Wurzel und Spross beteiligt sind (Abbildung 4.10, Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13). In *Arabidopsis* Wurzeln kann im Wildtyp, wenn die Wurzeln getrennt vom Spross verwundet wurden, ein Anstieg von JA und JA-Ile und ein Rückgang von OPDA detektiert werden. Sehr ähnliche Ergebnisse lassen sich auch in der *lox2* und *lox3/4* Mutante verzeichnen. Da es in Wildtyp Wurzeln nach dieser Art Verwundung und auch basal nur eine sehr geringe Expression des *LOX2* Gens gibt, ist das Ergebnis für diese Mutante nicht unerwartet. *LOX3* und *LOX4* zeigen jedoch nach Verwundung eine deutliche Zunahme der Transkriptmenge (Abbildung 3.1), ohne dass dies einen deutlichen Einfluss auf die Jasmonatproduktion in Wurzeln zu haben scheint. Dies verdeutlicht, dass die Enzymaktivität der LOX Enzyme nicht nur durch deren Expression reguliert sein kann, sondern auch andere Mechanismen daran beteiligt sein müssen. Die Regulation der Jasmonat-Bildung wird jedoch in einem späteren Kapitel (5.2.3) noch ausgiebiger diskutiert. Im Gegensatz zu *LOX2*, 3 und 4 spielt die *LOX6* in der Jasmonatproduktion der Wurzel nach Verwundung eine wichtige Rolle. In der *lox6* Mutante konnten weder nach Verwundung noch basal starke Jasmonatspiegel gemessen werden. Auch die Analyse von Jasmonaten nach osmotischem Stress und Trockenstress, welche im Wildtyp, der *lox2* und *lox3/4* Mutante zur vermehrten Bildung von OPDA und, in geringerem Maße, auch JA und JA-Ile in der Wurzel führen, zeigt in

der *lox6* Mutante weder basale Jasmonatspiegel noch einen deutlichen Jasmonat-Anstieg. Dies deutet darauf hin, dass die LOX6 das einzige der vier in *Arabidopsis* vorkommenden 13-LOX Enzyme ist, welches an der Jasmonatproduktion in der Wurzel von *Arabidopsis* beteiligt ist.

Im Spross ist die Situation eine andere. Hier nimmt, wie aus der Literatur bekannt, die LOX2 eine besonders wichtige Rolle in der Jasmonatproduktion nach Stress ein. In der vorliegenden Arbeit konnten in der *lox2* Mutante sowohl nach Verwundung, als auch nach Sorbitol-Stress und Trockenheit im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Jasmonatspiegel gemessen werden. Der stärkste Effekt zeigt sich bei Sorbitol-Behandlung, bei der es einen deutlichen Rückgang des OPDA-Gehalts und nahezu keinen Anstieg an JA und JA-Ile gab. Dies korreliert mit bereits publizierten Ergebnissen, welche eine Beteiligung der LOX2 an einem Großteil der Jasmonatproduktion in Blättern nach Verwundung, Sorbitol-Stress und Seneszenz, nicht aber nach Pathogen-Befall, beschreiben. Demnach ist die LOX2 für bis zu 75% der JA Produktion in Blättern nach Verwundung verantwortlich (Bell et al., 1995; Glauser et al., 2009; Seltsmann et al., 2010; Seltsmann et al., 2010; Zoeller et al., 2012). Neben den Effekten in der *lox2* Mutante konnten in der *lox3/4* Mutante ebenfalls reduzierte JA-Spiegel nach osmotischem Stress und in der *lox6* Mutante nach Verwundung detektiert werden. Für die LOX6 ist auch bereits die Beteiligung an der Jasmonatproduktion in der frühen Wundantwort von lokalen, verwundeten und auch distalen *Arabidopsis* Blättern bekannt (Chauvin et al., 2012). Dies zeigt, dass, anders als in der Wurzel, auch die anderen 13-LOX Enzyme, wenn auch in unterschiedlichem Maße, an der Produktion von Jasmonaten im Spross beteiligt sind. Noch deutlicher wird dies bei Betrachtung der OPDA-Spiegel im Spross der verschiedenen LOX-Mutanten. Dabei fällt auf, dass in der *lox6* Mutante die basalen OPDA-Spiegel im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer sind. Sie liegen basal an der Detektionsgrenze, steigen nach Verwundung und osmotischem Stress jedoch auf Wildtypniveau an. Dies zeigt, dass die Regulation der basalen Jasmonatspiegel und der Neusynthese von Jasmonaten nach Stresseinwirkung sehr komplex regulierte Vorgänge sind, deren Gesamtheit noch lange nicht vollständig verstanden ist.

5.2.3 Regulation der Jasmonat-Biosynthese nach Stress

Wie bereits in Kapitel 5.2.2 erwähnt wurde, spiegelt sich die Expression der verschiedenen 13-LOX Gene in Spross und Wurzel nicht zwingend in den gemessenen Jasmonatspiegeln wieder. So zeigen zwar Col-0 Wurzeln basal hauptsächlich LOX6 Expression und passend dazu in der *lox6* Mutante fehlende basale Jasmonatspiegel, jedoch steigt nach Verwundung die Expression von LOX6 nur gering an, die

Transkriptmenge von *LOX3* und *LOX4* hingegen stärker. Trotzdem zeigt die *lox3/4* Mutante nach Verwundung keine Veränderung der Jasmonat Spiegel im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen in der *lox6* Mutante in der Wurzel keine Synthese von Jasmonaten stattfindet. Ähnlich widersprüchlich erscheinende Effekte finden sich auch im Spross von *Arabidopsis*. Obwohl basal kaum *LOX6* Expression vorliegt, sondern hier *LOX2* basal am stärksten exprimiert ist, ist im Spross der *lox6* Mutante kein oder nur sehr wenig basales OPDA detektierbar. Nach Stress steigen die Jasmonat-Gehalte in dieser Mutante jedoch fast auf Wildtypniveau an. Andersherum ist in der *lox2* Mutante im Spross basales OPDA vorhanden, nach Stress gibt es jedoch keinen oder einen nur geringen Anstieg der Jasmonate. Auch nach Trockenheit lässt sich keine Verbindung zwischen der vermehrten Jasmonatsynthese in Spross und Wurzel und der Expression der 13-LOX Gene feststellen. Hier nimmt nach Trockenheit die Expression von *LOX6* in der Wurzel und *LOX2* im Blatt sogar drastisch ab (Abbildung 4.15). Diese Beobachtungen können durch verschiedene regulative Mechanismen verursacht werden. So ist es möglich, dass die 13-LOX Enzymaktivität durch posttranslationale Regulation spezifisch gesteuert wird. Es wurde in diesem Zusammenhang bereits gezeigt, dass der Ionenkanal FOU2 die *LOX2* Aktivität im Spross nach Verwundung beeinflusst (Bonaventure et al., 2007; Beyhl et al., 2009). Weiterhin ist es möglich, dass die unterschiedlichen 13-LOX Enzyme verschiedene Pools ihrer Produkte (13-HPOTEs) erzeugen, welche anschließend zu unterschiedlichen Produkten weiter metabolisiert werden. Neben der Bildung von Jasmonaten können HPOTEs in sechs weitere Stoffwechselwege eingeschleust werden. Dazu zählt unter anderem der Hydroperoxidlyase Weg oder der Peroxygenase Weg (Feussner and Wasternack, 2002). Dies könnte erklären, warum in den Wurzeln der *lox6* Mutante trotz verstärkter *LOX3* und *LOX4* Expression keine Jasmonate gebildet werden. Es wäre möglich, dass die Produkte dieser beiden LOX Enzyme in der Wurzel in andere Oxylipine als Jasmonate umgewandelt werden. Diese spezifische Weitermetabolisierung der durch unterschiedliche 13-LOX Enzyme gebildeten 13-HPOTEs müsste jedoch ebenfalls gewebespezifisch reguliert sein, da bereits bekannt ist, dass die *lox3/4* Mutante einen Jasmonat-typischen männlich sterilen Blütenphänotyp aufweist. Demnach werden im Infloreszenz-Gewebe durchaus Jasmonate aus *LOX3* und *LOX4* Produkten gebildet. Ob und wenn ja wie eine solche gewebeabhängige Regulation stattfindet ist bisher jedoch nicht bekannt.

Neben der Beobachtung, dass die Zunahme der Transkription verschiedener 13-LOX Gene nicht unbedingt in Zusammenhang mit einer Zunahme der Jasmonat Spiegel steht, ist ein weiterer Effekt zu beachten. So steigen die JA und JA-Ile Level in der Wildtyp Wurzel nach Verwundung an, obwohl der Gehalt an OPDA abnimmt. Dies lässt darauf schließen, dass bereits in der Wurzel vorhandenes OPDA nach Verwundung für die JA Biosynthese herangezogen wird. Diese These deckt sich mit der Beobachtung, dass in

der *lox6* Mutante, welche kein basales OPDA aufweist, nach Verwundung auch keine JA detektierbar ist. Ähnliche Effekte konnten auch Koo et al., 2009 in systemischen Blättern verwundeter Pflanzen zeigen. Auch hier sanken die OPDA Level zunächst stark ab, während es eine deutliche Zunahme der JA- und JA-Ile-Spiegel gab. Es ist möglich, dass in beiden Fällen die Umwandlung von OPDA zu JA der regulative Schritt ist. Der erste Schritt dieser Umwandlung wird in *Arabidopsis* durch das OPR3-Enzym katalysiert. Für die OPR3 wurde bereits in anderen Studien diskutiert, ob deren Aktivität posttranslational durch Homodimerisierung reguliert wird. Zwar konnte dies in *Arabidopsis* nicht direkt gezeigt werden, jedoch lässt die große Ähnlichkeit der *Arabidopsis* OPR3-Kristalle zu denen von Tomate, für die eine Dimerisierung gezeigt werden konnte, annehmen, dass dieser Regulationsmechanismus auch in *Arabidopsis* stattfindet. Die Homodimerisierung führt dabei zu einer Inhibition des Enzyms, welche eventuell durch reversible Phosphorylierung reguliert werden kann (Malone et al., 2005; Breithaupt et al., 2006; Acosta and Farmer, 2010). Neben der Möglichkeit der Regulation durch Homodimerisierung des OPR3-Enzyms wäre es auch denkbar, dass die Umwandlung von OPDA zu JA über den Transport von OPDA in die Peroxisomen reguliert wird. Über diesen Transportmechanismus ist bisher sehr wenig bekannt. Es wurde zwar gezeigt, dass neben der Möglichkeit der geringen Aufnahme der membranpermeablen, protonierten Form von OPDA (OPDA^H), in Blättern von *Arabidopsis* der ABC-Transporter Comatose (CTS oder PXA1) an der Aufnahme von OPDA in die Peroxisomen beteiligt ist (Zolman et al., 2001; Theodoulou et al., 2005). Gegenteilig konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine *Arabidopsis cts/pxa1* Mutante erhöhte OPDA-Spiegel in ihren Samen besitzt. (Dave et al., 2011). Es muss also noch weitere Möglichkeiten geben, wie OPDA in größeren Mengen in die Peroxisomen gelangen kann. Als eine Möglichkeit dafür wird die Aufnahme von OPDA über ein Transportsystem mit der Beteiligung einer CoA-Ligase spekuliert (Kienow et al., 2008). All diese möglichen Transportmechanismen können wiederum durch weitere Mechanismen reguliert werden und so ebenfalls zu der in dieser Arbeit beobachteten Steuerung der Umwandlung von OPDA zu JA beitragen. Nach Sorbitol-Stress, sowie nach Trockenstress, ist im Vergleich zum Verwundungsexperiment in der Wurzel kein Rückgang des OPDA-Spiegels, sondern ein Anstieg des selbigen zu finden. Dies zeigt eine weitere Möglichkeit der Regulation der Umwandlung von OPDA zu JA auf: den Zeitfaktor. Da Wurzeln, wie bereits erwähnt, weniger Plastiden besitzen als die Blätter, wäre eine Möglichkeit, dass bei dem schnellen Anstieg von JA nach Verwundung nicht genügend Biosynthesekapazität vorhanden ist, um einen Anstieg von OPDA in der kurzen Zeit zu erreichen. Für eine relativ langsame Neusynthese von OPDA, welches dann direkt, zusammen mit dem basal vorhandenen OPDA, zu JA weitersynthetisiert wird und deshalb nicht akkumuliert, spricht auch die Tatsache, dass die Gehalte an JA

in der Wurzel nach Verwundung mit 3-6 nmol g⁻¹ TG deutlich über den basalen Spiegeln von OPDA (0,7-2 nmol g⁻¹ TG) liegen. Die untersuchten Zeitpunkte der Jasmonat-Analyse sind beim Sorbitol- und Trockenstress mit 24 bzw. 48 Stunden deutlich später als bei Verwundung, zudem ist der JA-Anstieg geringer. So kann es der Pflanze auch mit weniger Plastiden in den Wurzeln möglich sein, höhere OPDA-Spiegel aufzubauen. Eine weitere Möglichkeit, warum JA und JA-Ile, nicht jedoch OPDA, nach Verwundung akkumulieren könnte an der fehlenden Bereitstellung von Arabidopsiden in der Wurzel liegen. Wie bereits zuvor erwähnt, werden die in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten vorkommenden Arabidopside als mögliche Quelle für die schnelle Freisetzung von OPDA in Blättern diskutiert (Kourtchenko et al., 2007; Bottcher and Pollmann, 2009; Stingl, 2011; Dave and Graham, 2012). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, besitzen Wurzeln keine Arabidopside. Deshalb wäre es für die Wurzel im Gegensatz zum Blatt nicht möglich, diesen OPDA-Pool zu nutzen und schnell hohe OPDA-Spiegel zu erreichen, welche nicht direkt zu JA weiter metabolisiert werden. Diese These gilt auch für Blätter der *lox2* Mutante. Hier konnte nach Verwundung ebenfalls ein Rückgang der OPDA-Spiegel mit einem gleichzeitigen Anstieg der JA und JA-Ile Gehalte gezeigt werden. Wie die Wurzeln, besitzt auch die *lox2* Mutante, wie aus der Literatur bekannt, keine, bzw. nur sehr geringe Arabidopside-Spiegel (Glaser et al., 2009; Seltmann, 2010).

5.2.4 Biologische Funktion von Oxylipinen in der Wurzel

In der Literatur gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass Oxylipine in der Wurzel verschiedener Pflanzen an der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress beteiligt sind. Dabei spielen neben den Jasmonaten als 13-LOX Produkte auch andere Oxylipine wie etwa durch 9-LOX Enzyme gebildete Verbindungen eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass in *Arabidopsis* Pflanzen Oxylipine, die über den 9-LOX Weg gebildet werden, biologische Aktivität etwa in der Regulation des Wurzelwachstums oder der Genexpression besitzen (Vellosillo et al., 2007). Auch wurde gezeigt, dass die Mais 9-LOX Mutante *lox3-4* empfindlicher auf den Befall mit Nematoden reagiert. Dieselbe Mutante ist auch resistenter gegen *Exserohilum pedicellatum*, einem pathogenen Wurzelpilz (Isakeit et al., 2007; Gao et al., 2008). Hinsichtlich der Jasmonate konnte in Schneckenklee (*Medicago truncatula*) die Akkumulation von JA nach Verwundung und in der Interaktion mit arbuskulären Mykorrhiza-Pilzen nachgewiesen werden. Mit Hilfe von AOC RNAi Linien wurde gezeigt, dass die Jasmonat-Bildung wichtig bei der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose ist, jedoch nicht an der Wurzelknöllchen Bildung selbst beteiligt ist (Isayenkov et al., 2005; Tretner et al., 2008; Zdyb et al., 2011). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Jasmonat-Synthese eine wichtige Rolle bei der Abwehr von *Arabidopsis*- und Maispflanzen gegen Spezies der im Boden lebenden

Oomyceten *Pythium* spielt. Sowohl die *Arabidopsis fad3/7/8* und *jar1* Mutante als auch die Mais *opr7/8* Mutante reagieren empfindlicher auf eine Infektion mit *Pythium* (Staswick et al., 1998; Vijayan et al., 1998; Yan et al., 2012). Auch an der Abwehr gegen den Oomyceten *Phytophthora parasitica* scheinen Jasmonate beteiligt zu sein. So wurde gezeigt, dass die *Arabidopsis jar1* Mutante nach *P. parasitica* Infektion mehr Infektionssymptome entwickelt als der entsprechend behandelte Wildtyp (Attard et al., 2010). JAR1 ist an der Synthese des biologisch aktiven JA Derivats JA-Ile beteiligt (Staswick et al., 1992; Suza and Staswick, 2008). Deshalb ist anzunehmen, dass die erhöhte Suszeptibilität dieser Mutante mit Jasmonaten in Verbindung steht. Genexpressionsanalysen zeigten zudem, dass in den Wurzeln von mit *P. parasitica* infizierten *Arabidopsis* Pflanzen 2,5 und 10 Stunden nach Infektion die Expression des *LOX6* Gens ansteigt (Hruz et al., 2008). Da die in der vorliegenden Arbeit verwendete *lox6* Mutante keine basalen Jasmonatspiegel und auch nach verschiedenen Stressen keinen Jasmonat-Anstieg aufweist, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von Katrin Borowsky die Interaktion von *P. parasitica* mit Col-0 und *lox6* Pflanzen untersucht. Leider konnte im Verlauf der Arbeit keine eindeutige Infektion von *Arabidopsis* Pflanzen mit *P. parasitica* erzielt werden. Aus diesem Grunde war es nicht möglich eine Aussage über die Suszeptibilität von *lox6* Pflanzen gegenüber diesem Oomyceten zu treffen (Borowsky, 2012).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde jedoch ein weiterer Aspekt bezüglich der Funktion von Jasmonaten näher untersucht. So wird in der Literatur immer wieder der hemmende Effekt von exogen applizierten Jasmonaten auf das Wurzelwachstum beschrieben (Staswick, 1992; Berger et al., 1996; Wasternack and Hause, 2000). Es ist jedoch nicht genau bekannt, ob dieser Effekt auch durch endogene Jasmonate ausgelöst wird. Katrin Borowsky konnte zeigen, dass die Wurzeln von Keimlingen der Jasmonat-defizienten *dde2* Mutante sowie die der *lox3/4* und *lox6* Mutanten nach sieben, zwölf und sechzehn Tagen signifikant länger waren als die des Wildtyps. Zwischen Wildtyp und *lox2* Mutante gab es zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied in der Wurzellänge. Die Mittelwerte der Wurzellängen sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Weiterhin wurde untersucht, ob der endogene Einfluss der Jasmonate auf die Wurzellänge durch exogene Gabe von JA komplementiert werden kann. Dabei zeigte sich, dass zwar das Wurzelwachstum aller verwendeten Pflanzenlinien durch die JA-Gabe verringert wird, es aber immer noch Unterschiede in der Länge zwischen Wildtyp und Mutanten Wurzeln gibt. Diese Unterschiede lassen sich durch die verschieden stark beeinträchtigte Stimulierung der JA-Synthese durch einen positiven *feedback-loop* Mechanismus erklären (Sasaki et al., 2001). Das Wurzelwachstum kann demnach sowohl endogen als auch exogen gehemmt werden, diese Effekte scheinen jedoch unterschiedlichen Regulationsmechanismen zu unterliegen (Borowsky, 2012).

Tabelle 5.1 Mittlere Wurzellänge \pm Standardabweichung von Col-0, *lox2*, *lox3/4*, *lox6* und *dde2* Keimlingen nach 7, 12 und 16 Tagen in mm

	7 Tage	12 Tage	16 Tage
Col-0	11,8 \pm 1,9	25,1 \pm 4,5	37,8 \pm 7,4
<i>lox2</i>	11,2 \pm 1,8	25,1 \pm 5,9	41,1 \pm 9,8
<i>lox3/4</i>	15,5 \pm 3,3	34,5 \pm 7,2	51,0 \pm 11,1
<i>lox6</i>	16,0 \pm 2,8	33,3 \pm 6,0	49,6 \pm 6,5
<i>dde2</i>	17,4 \pm 3,2	36,6 \pm 5,0	53,3 \pm 7,0

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Jasmonatspiegel in der Wurzel nach Trockenheit ansteigen. Zudem ist die *lox6* Mutante, welche keine Jasmonate in der Wurzel besitzt, empfindlicher gegen Trockenstress. Dies konnte sowohl an hydroponisch kultivierten Pflanzen, als auch an in Erde angezogenen Pflanzen gezeigt werden (Abbildung 4.18 bis Abbildung 4.21). Eine Arbeit von de Ollas et al., 2012 zeigt, dass bei Zitruspflanzen JA-Akkumulation in den Wurzeln nach Trockenheit für den ABA Anstieg in den Wurzeln benötigt wird, was einen Hinweis auf die Beteiligung von Jasmonaten an der Toleranz gegenüber Trockenstress gibt. Jedoch konnten in der *lox6* Mutante, trotz fehlender Jasmonat-Akkumulation, gleiche ABA-Spiegel wie im Wildtyp gemessen werden. Demnach muss es in *Arabidopsis* andere Regulationsmechanismen, unabhängig von JA und ABA, geben. Da die *dde2* Mutante hinsichtlich des Wasserverlustes und auch der Überlebensrate nach Trockenheit keinen suszeptibleren Phänotyp als der Wildtyp aufweist, ist es wahrscheinlich, dass nicht Jasmonate direkt an der Toleranz gegenüber Trockenheit beteiligt sind, sondern eventuell andere Oxylipine, wie Aldehyde, Epoxide, Hydroxide oder Divinyl-Ether, welche ebenfalls aus dem 13-LOX Produkt 13-HPOTE gebildet werden können (Feussner and Wasternack, 2002). Für verschiedene dieser Verbindungen ist bekannt, dass sie biologische Aktivitäten besitzen (Mosblech et al., 2009). So hat etwa, wie bereits in der Einleitung erwähnt, die über den Divinyl-Ether-Synthase-Weg gebildete Colneleinsäure Effekte auf die Mehltau-Infektion von Gerste (Cowley and Walters, 2005). Anhand welches Mechanismus die von der LOX6 generierten Oxylipine an der Toleranz gegenüber Trockenheit beteiligt sind, kann anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht genau geklärt werden. Eine Möglichkeit ist, dass bei Trockenheit in der Wurzel durch die LOX6 ein Langstreckensignal gebildet wird, welches die Wasserregulation des Sprosses beeinflusst. Für diese These der LOX6/Wurzelvermittelten Trockenheits-Robustheit spricht auch die Beobachtung, dass es bei abgeschnittenen Blättern von *lox6* und Col-0, im Gegensatz zu intakten Pflanzen, keinen Unterschied im Wasserverlust gibt. Einen weiteren Hinweis dafür liefert auch ein erstes Welke-Experiment mit gepfropften Col-0 Spross und *lox6* Wurzel Bastarden im Vergleich zu gepfropften Col-

0/Col-0 Kontrollen, bei dem ebenfalls die Tendenz zu schnellerem Welken gezeigt werden konnte (Abbildung 5.1). Zudem wurde in einer Studie gezeigt, dass die *LOX6* Expression besonders im Xylem der Pflanzen lokalisiert ist und die *LOX6* wurde als ein möglicher Kandidat für die Signalleitung von Jasmonaten nach lokaler Verwundung zu systemischen Blättern postuliert (Chauvin et al., 2012). Neben der Möglichkeit der Signalwirkung sollte jedoch auch nicht außer Acht gelassen werden, dass es Untersuchungen gibt die zeigen, dass Oxylipine wie JA und MeJA den Stomata-Schluss regulieren können (Suhita et al., 2004; Melotto et al., 2006; Munemasa et al., 2011). Zudem gibt es in den Geleitzellen der Spaltöffnungen von *Arabidopsis* *LOX6* Expression (Leonhardt et al., 2004). Dies zeigt, dass auch lokale Effekte in den Blättern an der Suszeptibilität der *lox6* Pflanzen gegenüber Trockenheit beteiligt sein könnten.

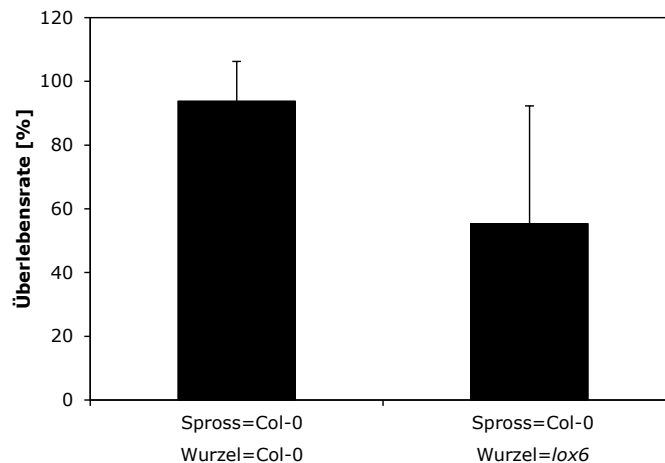


Abbildung 5.1 Überlebensrate von Col-0/Col-0 und Col-0/*lox6* Pflanzen 48 Stunden nach Wässerung in %. Die Pflanzen wurden vollständig welken gelassen und anschließend gewässert. (MW+STABW aus drei Experimenten, n=17/22)

Wie bereits erwähnt, gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Oxylipinen, darunter auch Jasmonaten, in der Wurzel bei der Interaktion und Abwehr von Pathogenen. Weiterhin ist die Funktion von Jasmonaten in der Abwehr von herbivoren Fressfeinden, wie etwa den Raupen der aschgrauen Höckereule (*Trichoplusia ni*) oder sogar Schildkröten, bekannt (Goodspeed et al., 2012; Mafli et al., 2012). 2009 konnte von E. Farmer und L. Dubugnon gezeigt werden, dass Kellersasseln (*P. scaber*), die Jasmonatfreie *Arabidopsis aos* Mutante bevorzugt gegenüber dem Jasmonat-haltigen Wildtyp fressen. Dies gilt sowohl für lebende Pflanzen, welche von den saprobionten Organismen normal nicht gefressen werden, als auch für frisch abgeschnittene Blätter. In der Arbeit von Farmer und Dubugnon wurde aufgrund dieser Beobachtungen diskutiert, ob Jasmonate am Schutz der Pflanzen gegen Saprobionten beteiligt sind und ob Jasmonate regulativ an der Geschwindigkeit des Kohlenstoff-Abbaus in absterbenden Blättern wirken können (Farmer and Dubugnon, 2009). Die Beobachtungen von Farmer

und Dubugnon konnten in der vorliegenden Arbeit mit Blättern und Wurzeln der *dde2* Mutante bestätigt werden (Abbildung A.4 und Abbildung 4.25). Zudem wurden auch Wurzeln der *lox6* Mutante, welche annähernd keine basalen Jasmonat Spiegel und keinen Jasmonat-Anstieg nach Stress aufweisen, schneller gefressen als Wildtyp Wurzeln. *lox6* Blätter wurden gegenüber dem Wildtyp nicht als Futter bevorzugt (Abbildung 4.23 und Abbildung 4.26). Dies unterstützt die These, dass tatsächlich Jasmonate an diesem Schutzmechanismus gegen Saprobionten beteiligt sind. Die Analyse der Jasmonat-Level in Blättern und Wurzeln von Col-0 und *lox6* Pflanzen nach Assel-Fraß zeigte nur einen sehr geringen Anstieg von JA und JA-Ile in den Blättern (Abbildung 4.29). Dies war jedoch unabhängig vom Assel-Fraß, da die Kontrollen ähnliche Werte wie die behandelten Proben aufwiesen. Die OPDA-Spiegel sanken in allen Proben sogar drastisch ab. Demnach scheinen die Jasmonate nicht direkt an diesem Schutzmechanismus beteiligt zu sein. Die Analysen der Jasmonat-Gehalte erfolgten zu relativ späten Zeitpunkten, wenn bereits einiges des Pflanzenmaterials gefressen wurde (für die Blätter 4 Tage, für die Wurzeln 7 Tage). Es ist möglich, dass das Gewebe zu diesen späten Zeitpunkten bereits begonnen hat abzusterben und dass es einen früheren Jasmonat-Anstieg gab, welcher zu den gewählten Analyse-Zeitpunkten nicht mehr detektierbar war. Dieser frühe Anstieg könnte die Bildung anderer Metabolite induziert haben welche den Kohlenstoffabbau und damit die Attraktivität des Gewebes für saprobionte Organismen, wie Kellersasseln, verzögern. Es gibt immer wieder Hinweise darauf, dass Jasmonate die Bildung anderer Metabolite wie Flavonoide, Alkaloide, flüchtige organische Verbindungen, Indol-Glucosinolate oder Phytoalexine, z.B. Camalexin, welches besonders in der Pathogenabwehr von *Arabidopsis* eine Rolle spielt, induzieren können (Wasternack and Hause, 2000; Liu et al., 2010; Stotz et al., 2011; Tamogami et al., 2012). Für die These, dass andere, durch Jasmonate induzierte Metabolite am Schutz der Pflanzen gegen saprobionte Organismen beteiligt sein können, spricht die Beobachtung, dass sowohl bei unverwundetem, als auch bei für 0,5 Stunden verwundetem und anschließend schockgefrorenem Blatt- und Wurzelmaterial jeweils keine deutlichen Unterschiede im Fressverhalten der Asseln beobachtet werden konnten (Abbildung 4.28 und Abbildung 4.30). In dem schockgefrorenen Material sind, durch Zerstörung der Funktionalität der Proteine, sämtliche enzymatische Reaktionen inhibiert. Demnach kann auch die Signalfunktion der Jasmonate zur spezifischen Bildung anderer Metabolite nicht mehr erfolgen. Der gewählte Zeitpunkt von 0,5 Stunden bis zum Schockgefrieren könnte zu kurz gewesen sein um die Bildung und Wirkung solcher Metabolite zu ermöglichen. Dies könnte die fehlenden Unterschiede im Fressverhalten der Asseln zwischen den schockgefrorenen Wildtyp und *lox6* Wurzeln erklären.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Oxylipinprofile von Wurzeln und Blättern starke Unterschiede aufweisen. Ein besonderer Fokus lag dabei auf den Jasmonaten. Es konnte aufgeklärt werden, dass die LOX6 eine sehr wichtige Rolle in der Bildung von Jasmonaten in der Wurzel einnimmt und dass in der entsprechenden KO Mutante deutlich reduzierte Jasmonatspiegel vorliegen. Um genauere Aussagen über die Biosynthese der Jasmonate in der Wurzel treffen zu können, wäre es interessant die Lokalisation des LOX6 Enzyms und auch der anderen Jasmonat-Biosynthese-Enzyme in der Wurzel näher zu untersuchen. Dazu könnten zum einen Mutanten verwendet werden, welche die entsprechenden Enzyme gekoppelt mit einem fluoreszierenden Protein (z.B. GFP) besitzen, zum anderen könnte eine direkte Immunodetektion der nativen Enzyme in *Arabidopsis* Wurzeln mit spezifischen Antikörpern erfolgen.

Hinsichtlich der Funktion der Jasmonate in der Wurzel wurde gezeigt, dass das Fehlen des LOX6 Enzyms einen Einfluss auf die Resistenz von *Arabidopsis* gegen Trockenheit hat, da die *lox6* Pflanzen empfindlicher gegenüber Wassermangel reagieren als der Wildtyp. Die molekularen Mechanismen wurden in dieser Arbeit jedoch nicht behandelt. Es ist eine interessante Aufgabe für die Zukunft, herauszufinden welche Oxylipine und Mechanismen an diesem Phänotyp beteiligt sind. Da, wie bereits zuvor diskutiert, die Jasmonat-freie *dde2* Mutante nicht empfindlicher gegen Trockenheit reagiert, scheinen es nicht die Jasmonate selbst, sondern evtl. andere aus dem 13-LOX Produkt 13-HPOT gebildeten Oxylipine zu sein. Dazu sollte eine tiefergehende Metabolom-Analyse von *lox6* und Wildtyp Pflanzen durchgeführt werden. Die bisher durchgeführten Experimente deuten zudem darauf hin, dass die Empfindlichkeit der *lox6* Pflanzen gegenüber Trockenheit über ein Signal aus der Wurzel vermittelt wird, da es keinen Unterschied im Wasserverlust abgetrennter Blätter von Wildtyp und *lox6* Mutante gibt und auch gepfropfte Col-0 Spross/*lox6* Wurzel Pflanzen die Tendenz des schnelleren Welkens zeigen. Dieser Aspekt sollte ebenfalls tiefergehend untersucht werden. Zum einen könnte das Welkeexperiment mit den gepfropften Pflanzen im größeren Maßstab wiederholt werden, um statistische Sicherheit zu erhalten. Zudem wäre es interessant, durch die zuvor erwähnte Metabolom-Analyse identifizierte Oxylipine, welche an der Vermittlung des Trockenheitssignals beteiligt sind, dahingehend zu testen, ob durch Behandlung der Wurzeln von *lox6* Pflanzen mit dieser Substanz eine erhöhte Resistenz der Pflanze gegenüber Trockenheit erzielt werden kann. Es wär auch möglich zu testen, ob diese Substanz generell ein Schließen der Spaltöffnungen in den Blättern auslösen kann.

Die zuvor erwähnte Metabolom-Analyse könnte zudem Aufschluss darüber geben, ob und wenn ja welche Metabolite in den Wurzeln der Wildtyp Pflanzen am Schutz gegenüber den saprobionten Kellerrasseln beteiligt sind. Denn auch hier wurde in dieser Arbeit zwar gezeigt, dass es einen Einfluss von Jasmonaten auf das Fressverhalten von *P. scaber* gibt, die Mechanismen konnten bisher jedoch nicht genau aufgedeckt werden. Die Identifikation möglicher Metabolite würde neue Möglichkeiten eröffnen zu untersuchen welche Prozesse in lebenden Pflanzenteilen und solchen deren Absterben grade erst beginnt ablaufen, um zu verhindern, dass saprobionte Organismen zu früh anfangen daran zu fressen.

Die Untersuchung der LOX6 Funktion in *Arabidopsis* mit Hilfe der verwendeten *lox6* Mutante könnte durch Hinzunahme einer *LOX6* Überexpressionslinie noch vervollständigt werden. Dabei wäre es interessant, ob eine erhöhte LOX6 Enzym-Menge einen Einfluss auf zum einen die Jasmonat-Gehalte der Wurzeln, zum anderen aber auch auf die Jasmonat-Gehalte der Blätter hat, da ja hier die Expression des *LOX6* Gens im Wildtyp sehr gering ausgeprägt ist. Andersherum gibt es in den Wurzeln nur sehr geringe *LOX2* Expression. Hier wäre es ebenfalls interessant zu untersuchen, ob die Überexpression der *LOX2* Einfluss auf die Jasmonatspiegel in den Wurzeln hat. Auch funktionelle Analysen dieser Mutanten im Vergleich zu den KO Linien wären sicherlich interessant. Aus diesem Grunde wurden im Rahmen dieser Arbeit von beiden Genen 35S::HA::LOX2 und 35S::HA::LOX6 Überexpressionslinien hergestellt, welche für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen.

6 Zusammenfassung

Oxylipine sind Signalmoleküle, welche durch die enzymatische oder nicht-enzymatische Oxidation von Fettsäuren gebildet werden. Eine bedeutende Gruppe von Oxylipinen in Pflanzen sind die Jasmonate. Dazu zählen Jasmonsäure (JA), deren Vorstufe 12-Oxophytodiensäure (OPDA) sowie deren Metabolite. Ein bedeutender Metabolit von JA ist das Aminosäure-Konjugat JA-Isoleucin (JA-Ile), welches hohe biologische Aktivität besitzt. Besonders für die oberirdischen Organe von Pflanzen wurden bisher vielfältige Funktionen von Jasmonaten beschrieben. Sie sind beteiligt an verschiedenen Entwicklungsprozessen wie der Fertilität von Blüten, aber auch an der Abwehr von Pathogenen und Herbivoren und bei der Reaktion von Pflanzen auf abiotische Stressoren wie hohe Salzkonzentrationen oder Trockenheit. Über die Bildung und Funktion von Oxylipinen in Wurzeln ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Gehalte von Galaktolipiden und Jasmonaten in Spross und Wurzel von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verglichen. Mit Hilfe verschiedener JA Biosynthese-Mutanten konnte zudem die Bildung von Jasmonaten in der Wurzel und deren biologische Funktion in diesem Pflanzenorgan untersucht werden. Um die Wurzeln der *Arabidopsis* Pflanzen einfach behandeln zu können und um schnell und stressfrei größere Mengen von Wurzelmaterial ernten zu können, wurde ein hydroponisches Anzuchtssystem etabliert.

Die Analyse von Galaktolipiden zeigte, dass in der Wurzel deutlich geringere Galaktolipid Gehalte als im Spross vorhanden sind. Da Galaktolipide den Hauptbestandteil plastidärer Membranen ausmachen, in den Wurzeln insgesamt jedoch weniger Plastiden vorkommen als in Blättern, wäre dies ein möglicher Grund für den beobachteten Unterschied. Das Vorkommen von mit OPDA oder dnOPDA veresterten Galaktolipiden (Arabidopsiden) wird in der Literatur für die Thylakoidmembranen der Chloroplasten beschrieben. Die Analyse der Arabidopsid Gehalte von Wurzeln konnte diese Aussage stützen, da in Wurzeln, welche normalerweise keine Chloroplasten besitzen, nahezu keine Arabidopside detektiert werden konnten.

Die Analyse der Jasmonate zeigte anhand von Pfropfungsexperimenten mit der Jasmonat-freien *dde2* Mutante, dass die Wurzeln unabhängig vom Spross in der Lage sind Jasmonate zu bilden, obwohl die Expression vieler JA-Biosynthese-Gene in den Wurzeln sehr gering ist. Zudem zeigten diese Experimente, dass es keinen direkten Transport von Jasmonaten zwischen Spross und Wurzel gibt. Die Bildung von Jasmonaten in der Wurzel konnte durch verschiedene Stresse wie Verwundung, osmotischen Stress oder Trockenheit induziert werden. Kälte und Salzstress hatten hingegen keinen Jasmonat-Anstieg in den Wurzeln zur Folge. Anders als bei

osmotischem Stress und Trockenheit, wo sowohl die Gehalte von OPDA als auch von JA und JA-Ile anstiegen, konnte bei Verwundung keine Zunahme der OPDA-Spiegel detektiert werden. Hier kam es zu einer deutlichen Abnahme, wohingegen die JA und JA-Ile Spiegel sehr stark anstiegen. Dies deutet darauf hin, dass es sehr komplexe und vielfältige Regulationsmechanismen hinsichtlich der Bildung von Jasmonaten gibt. Der erste Schritt der JA-Biosynthese, die Bildung von 13-Hydroperoxyfettsäuren (HPOTE), wird durch 13-Lipoxygenase (LOX) Enzyme katalysiert. In *Arabidopsis* sind vier unterschiedliche 13-LOX Isoformen bekannt. Die Untersuchung verschiedener 13-LOX-Mutanten ergab, dass nur die LOX6 an der Biosynthese von Jasmonaten in der Wurzel beteiligt ist. So konnten in Wurzeln der *lox6* Mutante weder basal noch nach verschiedenen Stressen bedeutende Mengen von Jasmonaten gemessen werden. Im Spross dieser Mutante war basal kein OPDA vorhanden, nach Stresseinwirkung wurden jedoch ähnliche Jasmonat Gehalte wie im Wildtyp detektiert.

Um Hinweise auf die biologische Funktion von Jasmonaten in Wurzeln zu erhalten, wurden Untersuchungen mit einer *lox6* KO Mutante durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass abgeschnittene *lox6* Wurzeln, welche keine Jasmonate bilden, im Vergleich zum Wildtyp von saprobiont lebenden Kellerasseln (*Porcellio scaber*) bevorzugt als Futter genutzt werden. Blätter dieser Mutante, welche nach Stress annähernd gleiche Jasmonat Gehalte wie der Wildtyp aufweisen, wurden nicht bevorzugt gefressen. Von der Jasmonat-freien *dde2* Mutante wurden hingegen sowohl die Wurzeln als auch die Blätter bevorzugt gefressen. Neben den Experimenten mit Kellerasseln wurden auch Welke-Versuche mit *lox6* und *dde2* Pflanzen durchgeführt. Hierbei wiesen die *lox6* Pflanzen, nicht aber die *dde2* Pflanzen, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Trockenheit auf. *dde2* Pflanzen haben im Gegensatz zu LOX Mutanten unveränderte 13-HPOTE Gehalte, aus denen auch andere Oxylipine als Jasmonate gebildet werden können. Dies zeigt, dass durch LOX6 gebildete Oxylipine, im Falle von Trockenheit aber nicht Jasmonate, an der Reaktion von *Arabidopsis* Pflanzen auf biotische und abiotische Stresse beteiligt sind.

7 Summary

Oxylipins are signaling molecules derived by enzymatic or non-enzymatic oxidation of fatty acids. Jasmonates are one important group of oxylipins in plant. This group includes jasmonic acid (JA), its precursor 12-oxophytodienoic acid, and all JA metabolites. The amino acid conjugate JA-isoleucine (JA-Ile) is one relevant metabolite of JA which shows high biological activity. For the aerial parts of plants, many different functions of jasmonates have been described. Jasmonates are involved in developmental processes like the flower fertility. Furthermore, these compounds function as signals in defense reactions against pathogens and herbivores and in the response to abiotic stress like high salt concentrations or drought. For roots, much less is known about the formation and function of jasmonates. Therefore, in this work the levels of galactolipids and jasmonates in roots of *Arabidopsis thaliana* in comparison to leaves were analyzed. Using mutants in different steps of jasmonate biosynthesis the formation and biological function of jasmonates in roots were investigated. For easy handling, treatment, and harvest of root material a hydroponic system was established.

The analysis of galactolipids showed reduced contents of these compounds in roots in comparison to the shoots. These differences might occur due to the fact that galactolipids are the main compounds of plastid membranes and that roots in general contain less plastids than the leaves. In the literature it is described, that galactolipids esterified with OPDA or dnOPDA (arabidopsides) only occur in the thylakoid membranes of chloroplasts. The analysis of arabidopsid contents in roots supports this statement since nearly no arabidopsides were detectable in roots, which do normally not have chloroplasts.

The analysis of jasmonates with different grafting experiments using the jasmonate free *dde2* mutant showed that roots were able to synthesize jasmonates independently of the shoot although the expression of several JA biosynthesis genes is very low. These experiments also pointed out that there is no transport of jasmonates between the shoot and the root. Jasmonates accumulated in roots upon different stresses such as wounding, osmotic stress, or drought. Cold and salt stress did not lead to increased jasmonate levels in the roots. Osmotic and drought stress resulted in an increase of all three analyzed jasmonates whereas after wounding only JA and JA-Ile showed higher concentrations. OPDA levels strongly decreased after this type of stress. This suggests the existence of diverse and complex regulatory mechanisms of stress-induced jasmonate synthesis. 13-lipoxygenase (13-LOX) enzymes are involved in the first step of the JA biosynthesis, the formation of 13-hydroperoxy fatty acids (HPOTE), and four 13-LOX isoforms exist in *Arabidopsis*. Investigation of different 13-LOX mutants

revealed that only the LOX6 enzyme is involved in the biosynthesis of jasmonates in roots. In roots of the *lox6* mutant no jasmonate levels were detectable, neither basal nor after different stress treatments. In the shoot of this mutant no basal OPDA was measurable. However, after stress treatment nearly the same amounts of jasmonates were detected.

To investigate the function of jasmonates in roots a *lox6* KO mutant was used. The experiments showed that detached roots of the *lox6* mutant which do not produce jasmonates were the preferred food of the detritivorous crustacean *Porcellio scaber* in comparison to roots of the wild type. Detached leaves of this mutant which show nearly the same amount of jasmonates after stress like the wild type were not eaten faster. However, detached roots and leaves of the jasmonate free *dde2* mutant were both preferred in comparison to the wild type. Besides the investigations with *P. scaber* also drought experiments were carried out. The *lox6* mutant but not *dde2* was more susceptible to drought. In contrast to LOX mutants, *dde2* plants show unaltered levels of 13-HPOTE which can also be converted to other oxylipins than jasmonates. This indicates that LOX6 derived oxylipins are important for the response to biotic and abiotic factors. However, concerning to drought this is not the case for jasmonates.

Literaturverzeichnis

- Acharya BR, Assmann SM** (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology* **69**: 451-462
- Acosta IF, Farmer EE** (2010) Jasmonates. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **8**: e0129
- Andreou A, Brodhun F, Feussner I** (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res* **48**: 148-170
- Attard A, Gourgues M, Callemeyn-Torre N, Keller H** (2010) The immediate activation of defense responses in Arabidopsis roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytol* **187**: 449-460
- Awai K, Marechal E, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Joyard J** (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10960-10965
- Babst BA, Ferrieri RA, Gray DW, Lerdau M, Schlyer DJ, Schueller M, Thorpe MR, Orians CM** (2005) Jasmonic acid induces rapid changes in carbon transport and partitioning in Populus. *New Phytol* **167**: 63-72
- Bannenber G, Martinez M, Hamberg M, Castresana C** (2009) Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of Arabidopsis thaliana. *Lipids* **44**: 85-95
- Bell E, Creelman RA, Mullet JE** (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8675-8679
- Berger S, Bell E, Mullet JE** (1996) Two Methyl Jasmonate-Insensitive Mutants Show Altered Expression of AtVsp in Response to Methyl Jasmonate and Wounding. *Plant Physiol* **111**: 525-531
- Berger S, Weichert H, Porzel A, Wasternack C, Kuhn H, Feussner I** (2001) Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochim Biophys Acta* **1533**: 266-276
- Beyhl D, Hortensteiner S, Martinoia E, Farmer EE, Fromm J, Marten I, Hedrich R** (2009) The fou2 mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium. *Plant J* **58**: 715-723
- Blee E** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* **37**: 33-72
- Block MA, Dorne AJ, Joyard J, Douce R** (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J Biol Chem* **258**: 13281-13286
- Bohlmann H, Vignutelli A, Hilpert B, Miersch O, Wasternack C, Apel K** (1998) Wounding and chemicals induce expression of the Arabidopsis thaliana gene Thi2.1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. *FEBS Lett* **437**: 281-286
- Bonaventure G, Gfeller A, Proebsting WM, Hortensteiner S, Chetelat A, Martinoia E, Farmer EE** (2007) A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in Arabidopsis. *Plant J* **49**: 889-898
- Borowsky K** (2012) Bedeutung der 13-Lipoxygenasen für die Entwicklung und Etablierung eines *Arabidopsis-Phytophthora* Pathosystems. Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

- Bottcher C, Pollmann S** (2009) Plant oxylipins: plant responses to 12-oxo-phytodienoic acid are governed by its specific structural and functional properties. *FEBS J* **276**: 4693-4704
- Bottcher C, Weiler EW** (2007) cyclo-Oxylipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics. *Planta* **226**: 629-637
- Brash AR** (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* **274**: 23679-23682
- Breithaupt C, Kurzbauer R, Lilie H, Schaller A, Strassner J, Huber R, Macheroux P, Clausen T** (2006) Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: self-inhibition by dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14337-14342
- Brodhun F, Feussner I** (2011) Oxylipins in fungi. *FEBS J* **278**: 1047-1063
- Browse J** (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 183-205
- Buseman CM, Tamura P, Sparks AA, Baughman EJ, Maatta S, Zhao J, Roth MR, Esch SW, Shah J, Williams TD, Welti R** (2006) Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* **142**: 28-39
- Caldelari D, Wang G, Farmer EE, Dong X** (2011) Arabidopsis *lox3 lox4* double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Molecular Biology* **75**: 25-33
- Camara B, Bardat F, Dogbo O, Brangeon J, Moneger R** (1983) Terpenoid Metabolism in Plastids : Isolation and Biochemical Characteristics of Capsicum annum Chromoplasts. *Plant Physiol* **73**: 94-99
- Campbell NA, Reece JB** (2003) Biologie, Ed 6. Spectrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Chauvin A, Caldelari D, Wolfender JL, Farmer EE** (2012) Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded Arabidopsis thaliana leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytol*
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**: 735-743
- Costigan SE, Warnasooriya SN, Humphries BA, Montgomery BL** (2011) Root-localized phytochrome chromophore synthesis is required for photoregulation of root elongation and impacts root sensitivity to jasmonic acid in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*
- Cowley T, Walters D** (2005) Local and systemic effects of oxylipins on powdery mildew infection in barley. *Pest Manag Sci* **61**: 572-576
- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE** (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4938-4941
- Dave A, Graham IA** (2012) Oxylipin Signaling: A Distinct Role for the Jasmonic Acid Precursor cis-(+)-12-Oxo-Phytodienoic Acid (cis-OPDA). *Front Plant Sci* **3**: 42
- Dave A, Hernandez ML, He Z, Andriotis VM, Vaistij FE, Larson TR, Graham IA** (2011) 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 583-599
- de Ollas C, Hernando B, Arbona V, Gomez-Cadenas A** (2012) Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiol Plant* **9999**

- De Simone S, Oka Y, Inoue Y** (2000) Effect of light on root hair formation in *Arabidopsis thaliana* phytochrome-deficient mutants. *Journal of Plant Research* **113**: 63-69
- Delker C, Stenzel I, Hause B, Miersch O, Feussner I, Wasternack C** (2006) Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*--enzymes, products, regulation. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 297-306
- Ding CK, Wang CY, Gross KC, Smith DL** (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* **214**: 895-901
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A** (2011) Geneious v5.5, Available from <http://www.geneious.com>
- Durand T, Bultel-Ponce V, Guy A, Berger S, Mueller MJ, Galano JM** (2009) New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes. *Lipids* **44**: 875-888
- Elkahoui S, Hernandez JA, Abdelly C, Ghrir R, Limam F** (2005) Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Science* **168**: 607-613
- Facchini PJ, Hagel J, Zulak KG** (2002) Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **80**: 577-589
- Falcone DL, Ogas JP, Somerville CR** (2004) Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* **4**: 17
- Fan XT, Mattheis JP, Fellman JK** (1998) A role for jasmonates in climacteric fruit ripening. *Planta* **204**: 444-449
- Fan XT, Mattheis JP, Fellman JK, Patterson ME** (1997) Changes in jasmonic acid concentration during early development of apple fruit. *Physiol Plant* **101**: 328-332
- Farmer EE, Dubugnon L** (2009) Detritivorous crustaceans become herbivores on jasmonate-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 935-940
- Farmer EE, Ryan CA** (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7713-7716
- Feussner I, Wasternack C** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275-297
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG** (1994) *Arabidopsis* Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R** (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* **5**: 344-350
- Fukushige H, Wang C, Simpson TD, Gardner HW, Hildebrand DF** (2005) Purification and identification of linoleic acid hydroperoxides generated by soybean seed lipoxygenases 2 and 3. *J Agric Food Chem* **53**: 5691-5694
- Fung RW, Wang CY, Smith DL, Gross KC, Tao Y, Tian M** (2006) Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and

- methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *J Plant Physiol* **163**: 1049-1060
- Funk CD** (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871-1875
- Gao X, Starr J, Gobel C, Engelberth J, Feussner I, Tumlinson J, Kolomiets M** (2008) Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 98-109
- Ghanem ME, Ghars MA, Frettinger P, Perez-Alfocea F, Lutts S, Wathelet JP, du Jardin P, Fauconnier ML** (2012) Organ-dependent oxylipin signature in leaves and roots of salinized tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J Plant Physiol* **169**: 1090-1101
- Glauser G, Dubugnon L, Mousavi SA, Rudaz S, Wolfender JL, Farmer EE** (2009) Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **284**: 34506-34513
- Glauser G, Grata E, Rudaz S, Wolfender JL** (2008) High-resolution profiling of oxylipin-containing galactolipids in *Arabidopsis* extracts by ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**: 3154-3160
- Goodspeed D, Chehab EW, Min-Venditti A, Braam J, Covington MF** (2012) *Arabidopsis* synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 4674-4677
- Grechkin A** (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* **37**: 317-352
- Hamberg M, Fahlstadius P** (1990) Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism. *Arch Biochem Biophys* **276**: 518-526
- Hamberg M, Samuelsson B** (1967) On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *J Biol Chem* **242**: 5329-5335
- Hamberg M, Sanz A, Castresana C** (1999) alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alpha-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem* **274**: 24503-24513
- Hasegawa S, Sogabe Y, Asano T, Nakagawa T, Nakamura H, Kodama H, Ohta H, Yamaguchi K, Mueller MJ, Nishiuchi T** (2011) Gene expression analysis of wounding-induced root-to-shoot communication in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment* **34**: 705-716
- He Y, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S** (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiol* **128**: 876-884
- Hisamatsu Y, Goto N, Sekiguchi M, Hasegawa K, Shigemori H** (2005) Oxylipins arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*. *J Nat Prod* **68**: 600-603
- Holzl G, Dormann P** (2007) Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. *Prog Lipid Res* **46**: 225-243
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorf F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P** (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* **2008**: 420747
- Hsu YY, Chao YY, Kao CH** (2012) Methyl jasmonate-induced lateral root formation in rice: The role of heme oxygenase and calcium. *J Plant Physiol*

- Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ** (2008) The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J Exp Bot* **59**: 2991-3007
- Hughes RK, West SI, Hornostaj AR, Lawson DM, Fairhurst SA, Sanchez RO, Hough P, Robinson BH, Casey R** (2001) Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers. *Biochem J* **353**: 345-355
- Hummel GM, Naumann M, Schurr U, Walter A** (2007) Root growth dynamics of *Nicotiana attenuata* seedlings are affected by simulated herbivore attack. *Plant Cell Environ* **30**: 1326-1336
- Hummel GM, Schurr U, Baldwin IT, Walter A** (2009) Herbivore-induced jasmonic acid bursts in leaves of *Nicotiana attenuata* mediate short-term reductions in root growth. *Plant Cell Environ* **32**: 134-143
- Huttner D, Bar-Zvi D** (2003) An improved, simple, hydroponic method for growing *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter* **21**: 59-63
- Ibrahim A, Schutz AL, Galano JM, Herrfurth C, Feussner K, Durand T, Brodhun F, Feussner I** (2011) The Alphabet of Galactolipids in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **2**: 95
- Isakeit T, Gao X, Kolomiets M** (2007) Increased resistance of a maize mutant lacking the 9-lipoxygenase gene, *ZmLOX3*, to root rot caused by *Exserohilum pedicellatum*. *Journal of Phytopathology* **155**: 758-760
- Isayenkov S, Mrosk C, Stenzel I, Strack D, Hause B** (2005) Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiol* **139**: 1401-1410
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K** (2001) The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2191-2209
- Ismail A, Riemann M, Nick P** (2012) The jasmonate pathway mediates salt tolerance in grapevines. *J Exp Bot* **63**: 2127-2139
- Isono K, Niwa Y, Satoh K, Kobayashi H** (1997) Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiol* **114**: 623-630
- Kienow L, Schneider K, Bartsch M, Stuible HP, Weng H, Miersch O, Wasternack C, Kombrink E** (2008) Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **59**: 403-419
- Kleinig H, Liedvogel B** (1978) Fatty acid synthesis by isolated chromoplasts from the daffodil. [¹⁴C]Acetate incorporation and distribution of labelled acids. *Eur J Biochem* **83**: 499-505
- Kobayashi K, Awai K, Takamiya K, Ohta H** (2004) *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol* **134**: 640-648
- Kobayashi K, Nakamura Y, Ohta H** (2009) Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants. *Plant Physiol Biochem* **47**: 518-525
- Kondo S, Fukuda K** (2001) Changes of jasmonates in grape berries and their possible roles in fruit development. *Scientia Horticulturae* **91**: 275-288

- Kondo S, Tomiyama A, Seto H** (2000) Changes of endogenous jasmonic acid and methyl jasmonate in apples and sweet cherries during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **125**: 282-287
- Koo AJ, Gao X, Jones AD, Howe GA** (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in Arabidopsis. *Plant J* **59**: 974-986
- Koo AJ, Howe GA** (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**: 1571-1580
- Koster J, Thurow C, Kruse K, Meier A, Iven T, Feussner I, Gatz C** (2012) Xenobiotic- and jasmonic acid-inducible signal transduction pathways have become interdependent at the Arabidopsis CYP81D11 promoter. *Plant Physiol* **159**: 391-402
- Kourtchenko O, Andersson MX, Hamberg M, Brunnstrom A, Gobel C, McPhail KL, Gerwick WH, Feussner I, Ellerstrom M** (2007) Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: jasmonate signaling dependence. *Plant Physiol* **145**: 1658-1669
- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wasternack C** (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "Oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol* **123**: 177-187
- Kuhn H, Wiesner R, Rathmann J, Schewe T** (1991) Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids* **4**: 9-14
- Lämmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lehmann J, Atzorn R, Bruckner C, Reinbothe S, Leopold J, Wasternack C, Parthier B** (1995) Accumulation of Jasmonate, Abscisic-Acid, Specific Transcripts and Proteins in Osmotically Stressed Barley Leaf Segments. *Planta* **197**: 156-162
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI** (2004) Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* **16**: 596-615
- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA** (2004) The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* **16**: 126-143
- Liavonchanka A, Feussner I** (2006) Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol* **163**: 348-357
- Liu F, Jiang H, Ye S, Chen WP, Liang W, Xu Y, Sun B, Sun J, Wang Q, Cohen JD, Li C** (2010) The Arabidopsis P450 protein CYP82C2 modulates jasmonate-induced root growth inhibition, defense gene expression and indole glucosinolate biosynthesis. *Cell Res* **20**: 539-552
- Liu L, Wei J, Zhang M, Zhang L, Li C, Wang Q** (2012) Ethylene independent induction of lycopene biosynthesis in tomato fruits by jasmonates. *J Exp Bot* **63**: 5751-5761
- Mafli A, Goudet J, Farmer EE** (2012) Plants and tortoises: mutations in the Arabidopsis jasmonate pathway increase feeding in a vertebrate herbivore. *Mol Ecol* **21**: 2534-2541
- Malone TE, Madson SE, Wrobel RL, Jeon WB, Rosenberg NS, Johnson KA, Bingman CA, Smith DW, Phillips GN, Jr., Markley JL, Fox BG** (2005) X-ray

- structure of Arabidopsis At2g06050, 12-oxophytodienoate reductase isoform 3. *Proteins* **58**: 243-245
- Mason HS, Mullet JE** (1990) Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. *Plant Cell* **2**: 569-579
- McConn M, Browse J** (1996) The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *Plant Cell* **8**: 403-416
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-980
- Molina A, Bueno P, Marin MC, Rodriguez-Rosales MP, Belver A, Venema K, Donaire JP** (2002) Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytol* **156**: 409-415
- Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M** (1997) Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* **9**: 2243-2259
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I** (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* **47**: 511-517
- Mueller MJ** (2004) Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 441-448
- Mueller S, Hilbert B, Dueckershoff K, Roitsch T, Krischke M, Mueller MJ, Berger S** (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 768-785
- Munemasa S, Mori IC, Murata Y** (2011) Methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid in guard cells. *Plant Signal Behav* **6**: 939-941
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Nahar K, Kyndt T, De Vleeschauwer D, Hofte M, Gheysen G** (2011) The Jasmonate Pathway Is a Key Player in Systemically Induced Defense against Root Knot Nematodes in Rice. *Plant Physiol* **157**: 305-316
- Nilsson AK, Fahlberg P, Ellerstrom M, Andersson MX** (2012) Oxo-phytodienoic acid (OPDA) is formed on fatty acids esterified to galactolipids after tissue disruption in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* **586**: 2483-2487
- Ogura Y, Ishihara A, Iwamura H** (2001) Induction of hydroxycinnamic acid amides and tryptophan by jasmonic acid, abscisic acid and osmotic stress in barley leaves. *Z Naturforsch C* **56**: 193-202
- Pauwels L, Inze D, Goossens A** (2009) Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends in plant science* **14**: 87-91
- Pedranzani H, Racagni G, Alemano S, Miersch O, Ramirez I, Pena-Cortes H, Taleisnik E, Machado-Domenech E, Abdala G** (2003) Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation* **41**: 149-158
- Piotrowska A, Bajguz A** (2011) Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**: 2097-2112
- Qadir M, Oster JD, Schubert S, Noble AD, Sahrawat KL** (2007) Phytoremediation of sodic and saline-sodic soils. *Advances in Agronomy, Vol 96* **96**: 197-247

- Raya-Gonzalez J, Pelagio-Flores R, Lopez-Bucio J** (2012) The jasmonate receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and lateral root positioning in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* **169**: 1348-1358
- Routaboul JM, Fischer SF, Browse J** (2000) Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiol* **124**: 1697-1705
- Sakai T, Wada T, Ishiguro S, Okada K** (2000) RPT2: A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 225-236
- Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Tabata S** (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res* **8**: 153-161
- Schaller F, Biesgen C, Mussig C, Altmann T, Weiler EW** (2000) 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* **210**: 979-984
- Schillmiller AL, Howe GA** (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 369-377
- Schlesier B, Breton F, Mock HP** (2003) A hydroponic culture system for growing *Arabidopsis thaliana* plantlets under sterile conditions. *Plant Molecular Biology Reporter* **21**: 449-456
- Schmidt L, Hummel GM, Schottner M, Schurr U, Walter A** (2010) Jasmonic acid does not mediate root growth responses to wounding in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment* **33**: 104-116
- Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT** (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12935-12940
- Seltmann MA** (2010) Bildung und Funktion von Jasmonaten während Seneszenz-Prozessen in *Arabidopsis thaliana*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg
- Seltmann MA, Hussels W, Berger S** (2010) Jasmonates during senescence: signals or products of metabolism? *Plant Signal Behav* **5**: 1493-1496
- Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Krischke M, Mueller MJ, Berger S** (2010) Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**: 1940-1950
- Shi Y, An L, Li X, Huang C, Chen G** (2011) The octadecanoid signaling pathway participates in the chilling-induced transcription of omega-3 fatty acid desaturases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **49**: 208-215
- Shibata D, Slusarenko A, Casey R, Hildebrand D, Bell E** (1994) Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**: 41-42
- Shimizu T, Radmark O, Samuelsson B** (1984) Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 689-693
- Smith DP, Kock JL, Motaung MI, van Wyk PW, Venter P, Coetzee DJ, Nigam S** (2000) Ascospore aggregation and oxylipin distribution in the yeast *Dipodascopsis tothii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**: 389-392
- Spiteller P, Kern W, Reiner J, Spiteller G** (2001) Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochim Biophys Acta* **1531**: 188-208
- Staswick PE** (1992) Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol* **99**: 804-807

- Staswick PE, Su W, Howell SH** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6837-6840
- Staswick PE, Tiryaki I** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2117-2127
- Staswick PE, Tiryaki I, Rowe ML** (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-1415
- Staswick PE, Yuen GY, Lehman CC** (1998) Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J* **15**: 747-754
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C** (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**: 895-911
- Stingl N** (2011) Regulation der Jasmonatbiosynthese durch Lipasen in *Arabidopsis thaliana*. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
- Stotz HU, Sawada Y, Shimada Y, Hirai MY, Sasaki E, Krischke M, Brown PD, Saito K, Kamiya Y** (2011) Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant J* **67**: 81-93
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A** (2004) Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* **134**: 1536-1545
- Suza WP, Staswick PE** (2008) The role of JAR1 in Jasmonoyl-L: -isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta* **227**: 1221-1232
- Tamogami S, Noge K, Abe M, Agrawal GK, Rakwal R** (2012) Methyl jasmonate is transported to distal leaves via vascular process metabolizing itself into JA-Ile and triggering VOCs emission as defensive metabolites. *Plant Signal Behav* **7**
- Tani T, Sobajima H, Okada K, Chujo T, Arimura S, Tsutsumi N, Nishimura M, Seto H, Nojiri H, Yamane H** (2008) Identification of the OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta* **227**: 517-526
- Theodoulou FL, Job K, Slocombe SP, Footitt S, Holdsworth M, Baker A, Larson TR, Graham IA** (2005) Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol* **137**: 835-840
- Tocquin P, Corbesier L, Havelange A, Pieltain A, Kurtem E, Bernier G, Perilleux C** (2003) A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **3**: 2
- Toth R, Kevei E, Hall A, Millar AJ, Nagy F, Kozma-Bognar L** (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 1607-1616
- Tretner C, Huth U, Hause B** (2008) Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid. *J Exp Bot* **59**: 2847-2856
- Turnbull CG, Booker JP, Leyser HM** (2002) Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J* **32**: 255-262
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* **14** Suppl: S153-164

- Ueda J, Kato J** (1980) Isolation and Identification of a Senescence-promoting Substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol* **66**: 246-249
- van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flugge UI, Kunze R** (2006) Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol* **141**: 776-792
- Vellosillo T, Martinez M, Lopez MA, Vicente J, Cascon T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C** (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* **19**: 831-846
- Vick BA, Zimmerman DC** (1983) The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **111**: 470-477
- Vick BA, Zimmerman DC** (1984) Biosynthesis of jasmonic Acid by several plant species. *Plant Physiol* **75**: 458-461
- Vijayan P, Shockey J, Levesque CA, Cook RJ, Browse J** (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7209-7214
- Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chetelat A, Farmer EE** (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **24**: 467-476
- von Malek B, van der Graaff E, Schneitz K, Keller B** (2002) The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* **216**: 187-192
- Wang SC, Ichii M, Taketa S, Xu LL, Xia K, Zhou X** (2002) Lateral root formation in rice (*Oryza sativa*): promotion effect of jasmonic acid. *J Plant Physiol* **159**: 827-832
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J** (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* **1**: 198-217
- Wasternack C, Hause B** (2000) Jasmonate - Signale zur Stressabwehr und Entwicklung in Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit* **30**: 312-319
- Wasternack C, Kombrink E** (2010) Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS chemical biology* **5**: 63-77
- Weber H, Vick BA, Farmer EE** (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10473-10478
- Weidhase RA, Kramell HM, Lehmann J, Liebisch HW, Lerbs W, Parthier B** (1987) Methyljasmonate-Induced Changes in the Polypeptide Pattern of Senescing Barley Leaf Segments. *Plant Science* **51**: 177-186
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG** (1998) COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094
- Yamane H, Takagi H, Abe H, Yokota T, Takahashi N** (1981) Identification of Jasmonic Acid in Three Species of Higher Plants and Its Biological Activities. *Plant Cell Physiol* **22**: 689-697
- Yan Y, Christensen S, Isakeit T, Engelberth J, Meeley R, Hayward A, Emery RJ, Kolomiets MV** (2012) Disruption of OPR7 and OPR8 reveals the versatile

- functions of jasmonic acid in maize development and defense. *Plant Cell* **24**: 1420-1436
- Yan Y, Stolz S, Chetelat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE** (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**: 2470-2483
- Yang W, Devaiah SP, Pan X, Isaac G, Welti R, Wang X** (2007) AtPLAI is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and Arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea*. *J Biol Chem* **282**: 18116-18128
- Yoshida Y, Sano R, Wada T, Takabayashi J, Okada K** (2009) Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in Arabidopsis. *Development* **136**: 1039-1048
- Zdyb A, Demchenko K, Heumann J, Mrosk C, Grzeganeck P, Gobel C, Feussner I, Pawlowski K, Hause B** (2011) Jasmonate biosynthesis in legume and actinorhizal nodules. *New Phytol* **189**: 568-579
- Zhang Y, Turner JG** (2008) Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS One* **3**: e3699
- Zhao ML, Wang JN, Shan W, Fan JG, Kuang JF, Wu KQ, Li XP, Chen WX, He FY, Chen JY, Lu WJ** (2012) Induction of jasmonate signalling regulators MaMYC2s and their physical interactions with MaICE1 in methyl jasmonate-induced chilling tolerance in banana fruit. *Plant Cell Environ*
- Zien CA, Wang C, Wang X, Welti R** (2001) In vivo substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLD α , to wound-induced metabolism of lipids in Arabidopsis. *Biochim Biophys Acta* **1530**: 236-248
- Zoeller M, Stingl N, Krischke M, Fekete A, Waller F, Berger S, Mueller MJ** (2012) Lipid profiling of the Arabidopsis hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic Acid. *Plant Physiol* **160**: 365-378
- Zolfagharinasab R, Hadian J** (2007) Influence of methyl jasmonate on inducing chilling tolerance in pomegranate fruits (Malas Save). *Pak J Biol Sci* **10**: 612-616
- Zolman BK, Silva ID, Bartel B** (2001) The Arabidopsis *pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol* **127**: 1266-1278

Anhang

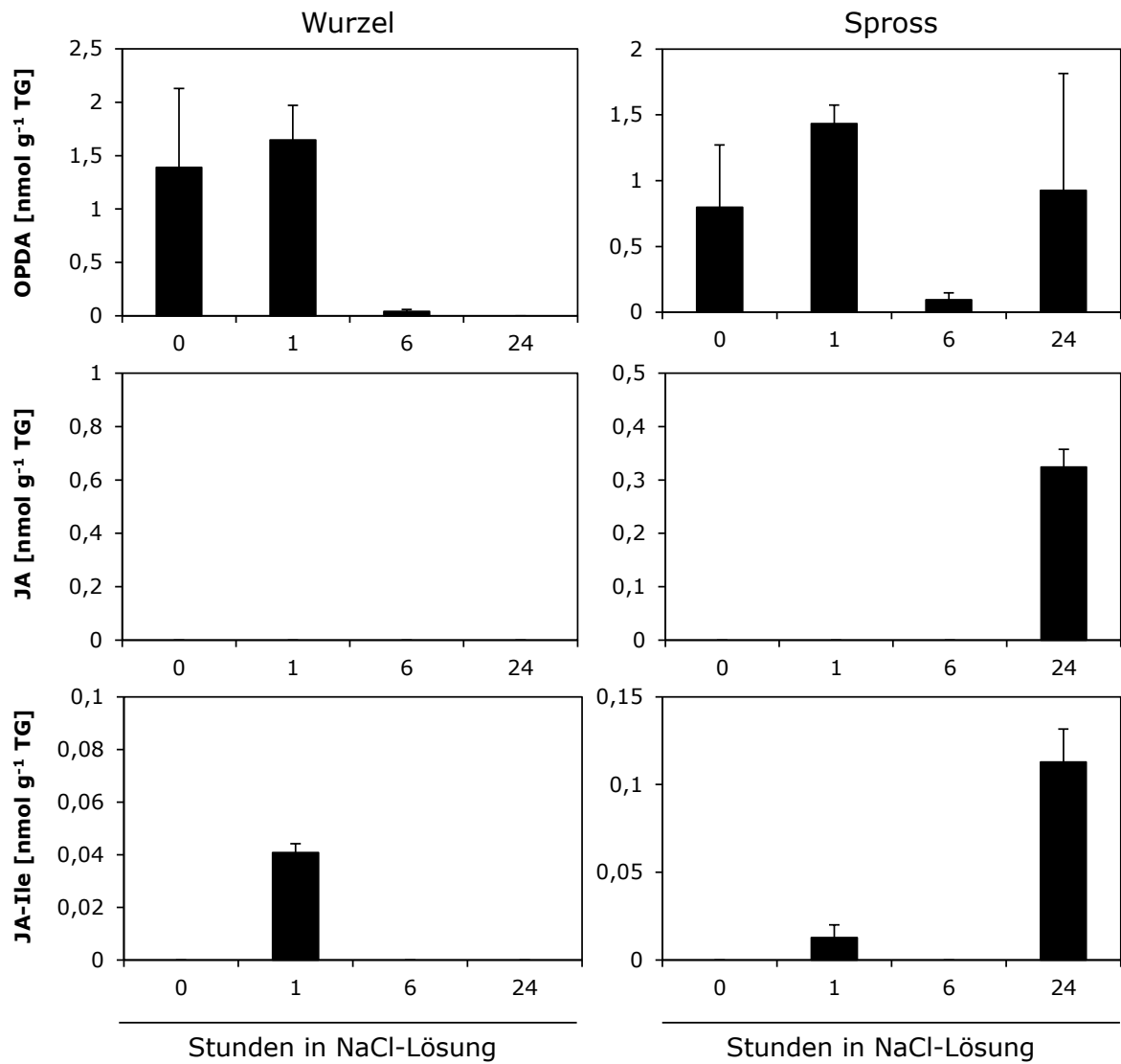


Abbildung A.1 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp Pflanzen nach Salz Stress. Das Medium der Pflanzen wurde durch 150 mM NaCl-Lösung ersetzt und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile nach 0, 1, 6 und 24 Stunden analysiert.

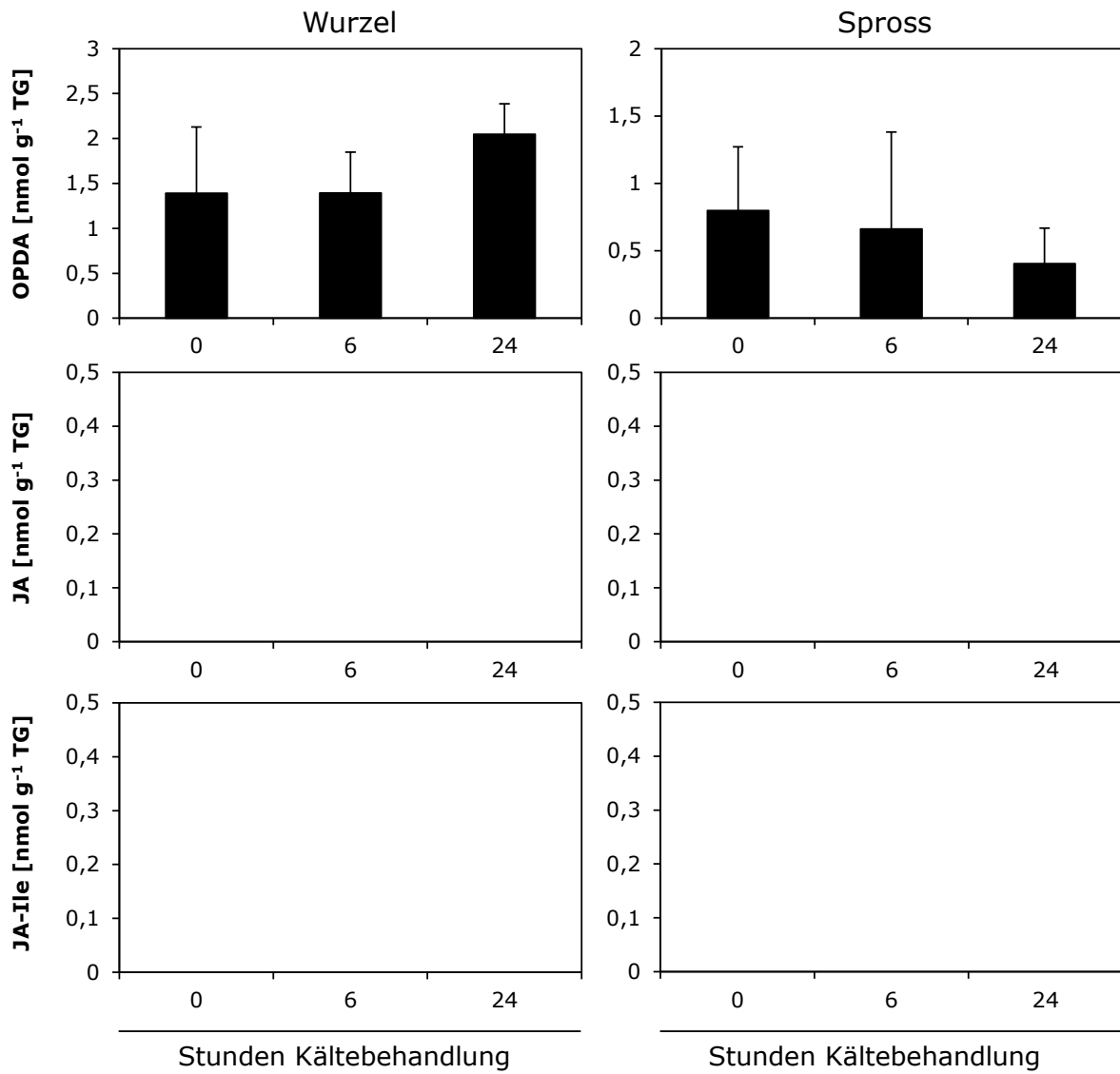


Abbildung A.2 Jasmonat Analyse in Wurzel und Spross von Wildtyp Pflanzen nach Kälte Stress. Das Medium der Pflanzen wurde durch ein Eisbad gekühlt und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile nach 0, 1, 6 und 24 Stunden analysiert.

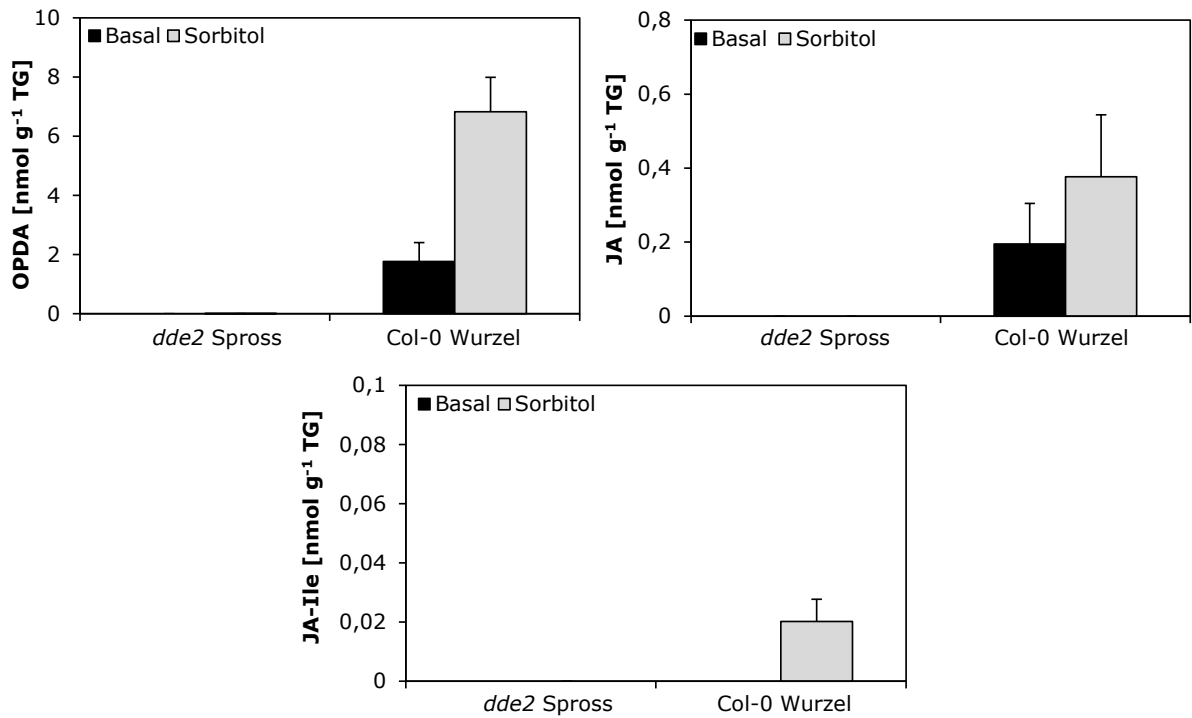


Abbildung A.3 Jasmonat-Gehalte in Wurzel und Spross gepfropfter *dde2* und Col-0 Pflanzen nach 0,5 M Sorbitolbehandlung. Spross und Wurzel wurden nach 24 Stunden getrennt und die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile nach Sorbitol bzw. Wasser Behandlung analysiert. (MW+STABW, n= 3)



Abbildung A.4 Fütterung von *P. scaber* mit Col-0 und *dde2* Blättern. Blätter von 6 Wochen alten Col-0 und *dde2* Pflanzen wurden den Kellerasseln als Futter gegeben und das Fressverhalten mit Fotos (0 und 4,5 und 20 Stunden) dokumentiert.

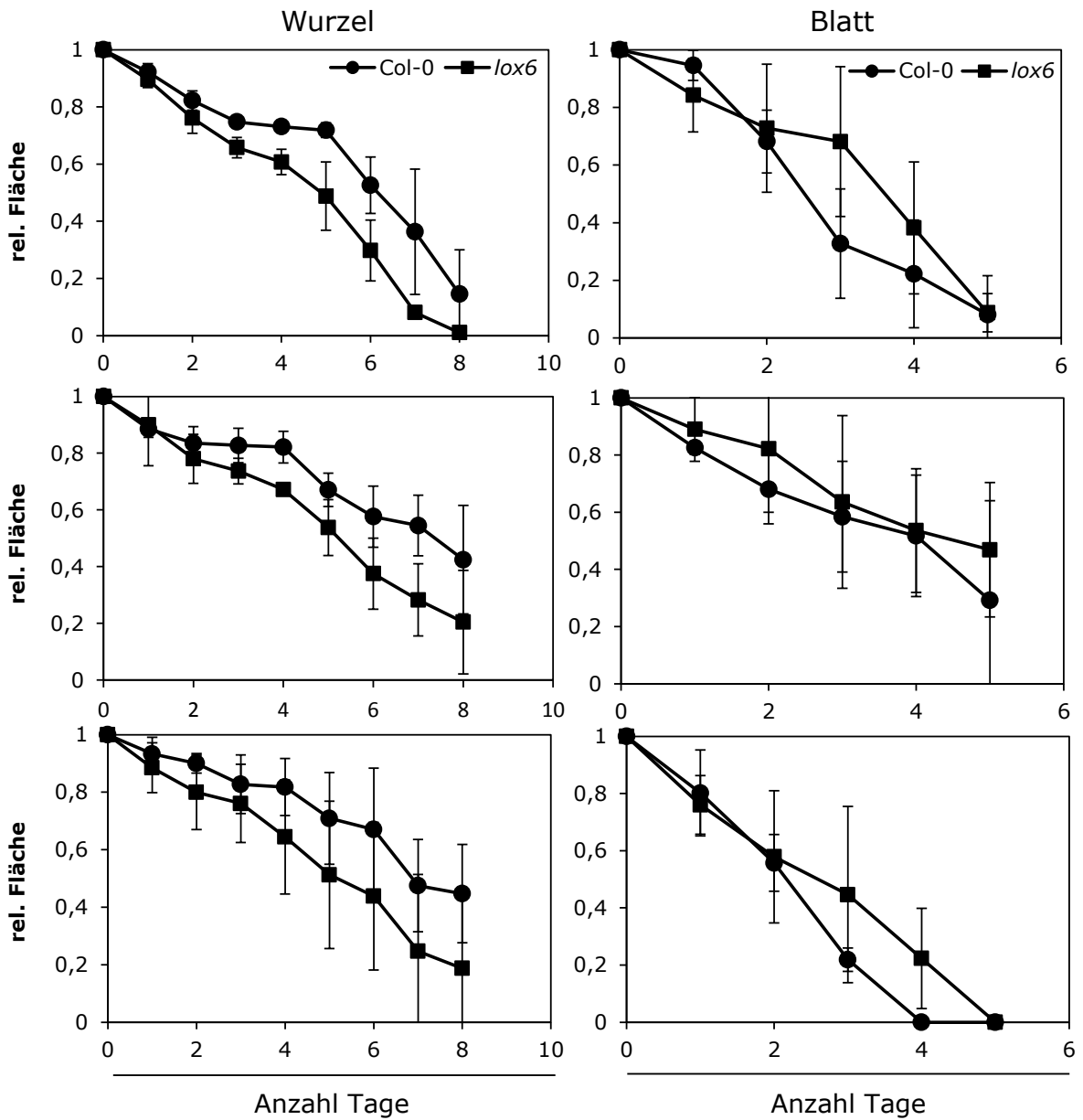


Abbildung A.5 Fütterung von *P. scaber* mit Col-0 und *lox6* Wurzeln und Blättern. Wurzeln und Blätter von 6 Wochen alten Col-0 und *lox6* Pflanzen wurden den Kellerrasseln als Futter dargeboten und die relative Fläche zu Beginn des Experiments und über 8 bzw. 5 Tage ermittelt. (MW±STABW, n=3)

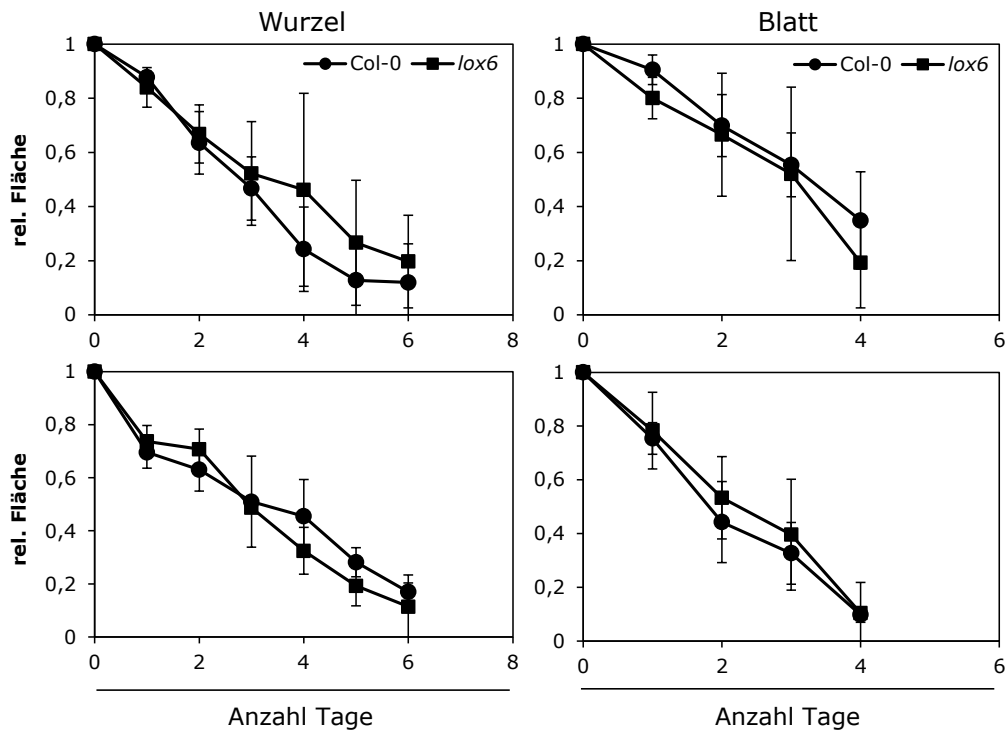


Abbildung A.6 Fütterung von *P. scaber* mit zuvor schockgefrorenen Col-0 und *lox6* Wurzeln und Blättern. Wurzeln und Blätter von 6 Wochen alten Col-0 und *lox6* Pflanzen wurden den Kellerasseln als Futter dargeboten und die relative Fläche zu Beginn des Experiments und über 6 bzw. 4 Tage ermittelt. (MW±STABW, n=3)

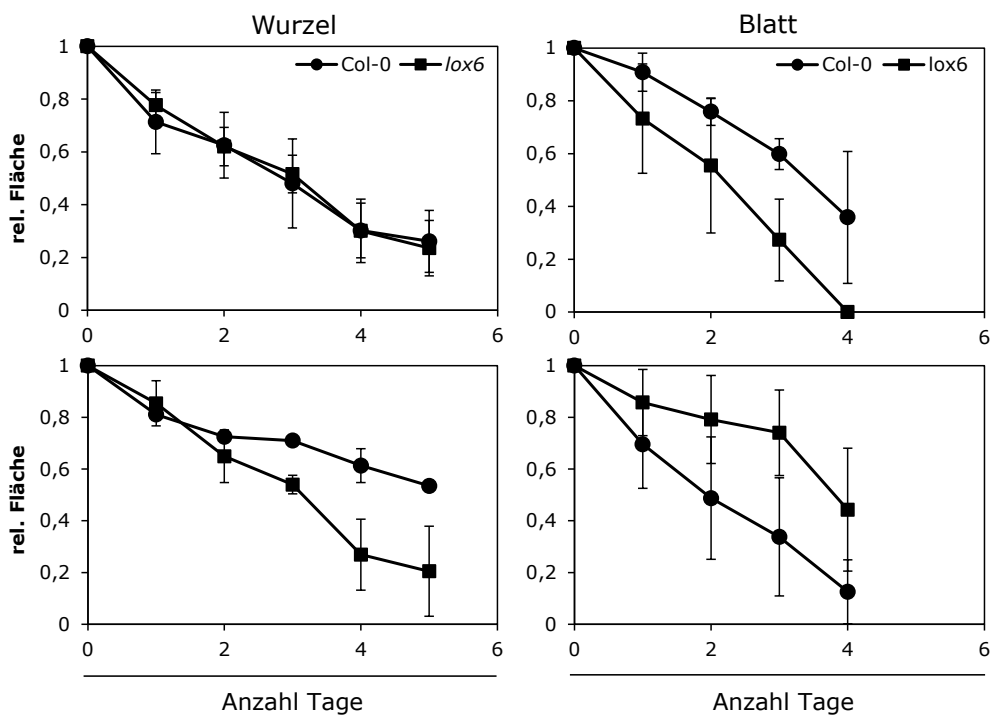


Abbildung A.7 Fütterung von *P. scaber* mit zuvor 0,5 Stunden verwundeten, schockgefrorenen Col-0 und *lox6* Wurzeln und Blättern. Wurzeln und Blätter von 6 Wochen alten Col-0 und *lox6* Pflanzen wurden den Kellerasseln als Futter dargeboten und die relative Fläche zu Beginn des Experiments und über 5 bzw. 4 Tage ermittelt. (MW±STABW, n=3)

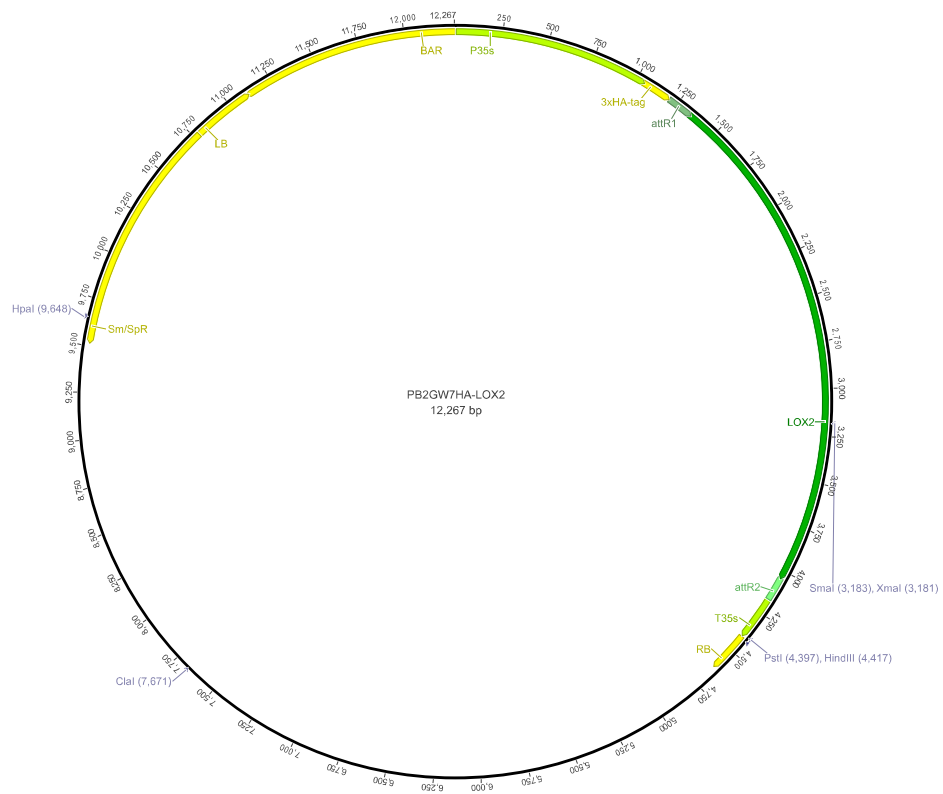


Abbildung A.8 Vektorkarte von pB2GW7-HA mit inseriertem *LOX2* Gen (Drummond et al., 2011).

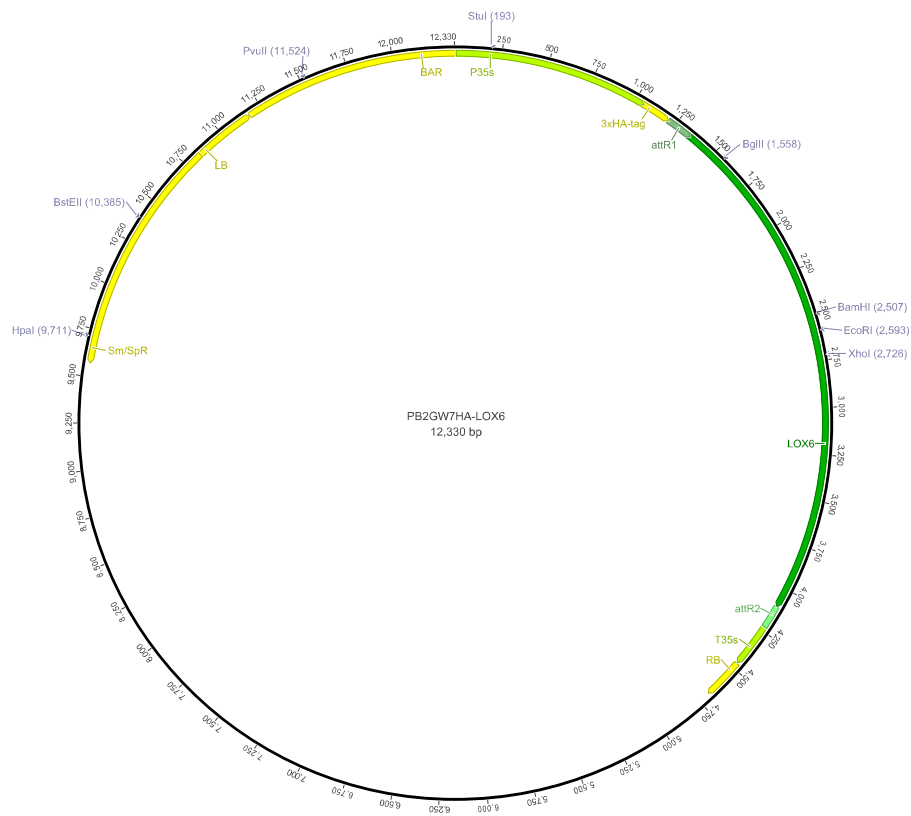


Abbildung A.9 Vektorkarte von pB2GW7-HA mit inseriertem *LOX6* Gen (Drummond et al., 2011).

Danksagung

Diese Stelle möchte ich dazu nutzen, allen zu danken, die mich auf dem Weg zu der vorliegenden Arbeit sowohl fachlich, als auch persönlich, unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt PD Dr. Susanne Berger für die Betreuung meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen. Das sehr interessante Thema, die vielen Freiheiten bei der Gestaltung meiner Arbeit und die Unterstützung bei Problemen sind nur einige Punkte, welche die Doktorarbeit zu einer schönen Zeit gemacht haben.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Rob Roelfsema für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Martin J. Müller, dass ich diese Arbeit an seinem Lehrstuhl im Rahmen des GK1342 anfertigen konnte. Besonders die Möglichkeit regelmäßig an Seminaren und internationalen Tagungen teilnehmen zu können hat meiner Arbeit immer wieder neue Anreize gegeben.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen ganzen Kollegen des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie bedanken, die Ihr mir alle immer wieder bei größeren oder kleineren Problemen gerne weitergeholfen habt. Die gemeinsamen Unternehmungen und die vielen schönen Mittagspausen mit Euch werde ich bestimmt nicht so schnell vergessen. Ich habe mich entschlossen, an dieser Stelle auf die Erwähnung einzelner Namen zu verzichten, so dass ich auch bestimmt keinen auslasse.

Ohne die fleißige Mitarbeit meiner Praktikanten und Hiwis und besonders ohne das Engagement von Katrin und Ayla wäre die Arbeit oft nicht so gut und schnell vorangegangen. Dafür möchte ich mich bei Euch bedanken.

Ganz herzlich möchte ich auch meiner Familie danken. Besonders meinen Eltern, ohne die mein Studium und mein Wechsel nach Würzburg nicht möglich gewesen wären.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Christoph. Ohne dich wäre ich vor Weihnachten nicht fertig geworden!

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 08.12.2012

Wiebke Grebner