

Charakterisierung der Aerenchymbildung in Internodien von Reis (*Oryza sativa* L.)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Thomas Geske
aus Frankfurt (Oder)

Kiel
2013

Erste Gutachterin: PD Dr. Bianka Steffens

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Margret Sauter

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2014

Zum Druck genehmigt: 17.01.2014

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

„Um ein tadelloses Mitglied einer Schafherde sein zu können, muss man vor allem ein Schaf sein.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
Zusammenfassung	1
Summary	2
Einleitung	3
Morphologische Anpassungen von Reis an Überflutung	3
Das Phytohormon Ethylen	9
Die Rolle von Gibberellin, Abscisinsäure und Auxin in der Hypoxie-Antwort ..	13
Rolle von ROS bei der Antwort auf Überflutung	15
Zelluläre Charakteristika von Zelltodprozessen <i>in planta</i>	17
Zielsetzung	21
Kapitel 1	22
Aerenchymbildung in Reisinternodien ist Ethylen-induziert und H ₂ O ₂ -vermittelt	22
Kapitel 2	33
Weitere funktionelle und pharmakologische Charakterisierung der Aerenchymbildung und zytologische Untersuchungen des Zelltods	33
Material und Methoden	34
Ergebnisse.....	48
Abschließende Diskussion und Ausblick	85
Lysigene Aerenchymbildung in Reisinternodien ermöglicht eine erleichterte Sauerstoffdiffusion und verringert die Zellzahl	85
Die Phytohormone Ethylen, Auxin und Abscisinsäure sind in die Aerenchymbildung involviert	89
O ₂ ⁻ inhibiert, H ₂ O ₂ induziert Aerenchymbildung in Reisinternodien	95
Zelluläre Charakterisierung der Präaerenchymzellen.....	98
Literatur	105
Eidesstattliche Erklärung	128
Danksagung	129
Lebenslauf	130

Abkürzungsverzeichnis

1-MCP	1-Methylcyclopropen
1-NAA	1-Naphthylelessigsäure
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
ABA	Abscisinsäure
ACBP	Acyl-CoA-bindendes Protein
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure
ACO	ACC-Oxidase
ACS	ACC-Synthase
ADH	Alkoholdehydrogenase
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
ARL	ADVENTITIOUS ROOTLESS
AT	3-Amino-1,2,4-triazol
ATP	Adenosintriphosphat
AUX1	AUXIN-INFLUX-CARRIER1
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTR1	CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1
Cyt c	Cytochrom c
D1	DWARF 1
DDC	Diethyldithiocarbamat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenylen Iodonium
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIL	ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE
EIN	ETHYLENE INSENSITIVE
ERF	ETHYLENE RESPONSE FACTOR
ERL	ETHYLENE RESPONSE LIKE
ERS	ETHYLENE RESPONSE SENSOR
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
ETR	ETHYLENE RESISTANCE

FG	Frischgewicht
FID	Flammenionisationsdetektor
GA	Gibberellinsäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GC	Gaschromatographie
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor
GID1	GA INSENSITIVE DWARF1
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HO ₂ [•]	Perhydroxyl-Radikal
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Indol-3-essigsäure
IPA	Indol-3-pyruvat-Weg
JC-1	5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid
LC-ESI-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LEA	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT
LOES	<i>low oxygene escape syndrome</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NCED	9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase
NDGA	Nordihydroguaiaretische Säure
NPA	1-N-Naphthylphtalaminsäure
O ₂ ^{•-}	Superoxidanion-Radikal
O ₃	Ozon
[•] OH	Hydroxyl-Radikal
PG56	Pin Gaew 56
PIN	PINFORMED
PP2C	Serin/Threonin-Phosphatasen des Typs 2C

PVP	Polyvinylpyrrolidon
PYL	PYRABACTIN RESISTANCE PROTEIN1-Like
PYR1	PYRABACTIN RESISTANCE PROTEIN1
RAP	RELATED TO APETALA
RBOH	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG
RCAR	REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR
RO [•]	Alkoxy-Radikal
ROS	Reactive oxygen species
rTdT	rekombinante, terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
SAM	S-Adenosylmethionin
SK	SNORKEL
SLR1	SLENDER RICE1
SLRL1	SLENDER RICE1-LIKE1
SNF	SUCROSE-NONFERMENTING KINASE
SOD	Superoxid-Dismutase
SUB1	SUBMERGENCE1
TAM	Tryptamin-Weg
TCD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (<i>thermal conductivity detector</i>)
TE	Tris/EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP <i>nick-end labeling</i>
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Reis (*Oryza sativa* L.) als semi-aquatische Spezies kann Überflutung und hypoxische Bedingungen durch morphologische Anpassungen wie Aerenchymbildung im Internodium tolerieren. Überflutung fördert durch Akkumulation von Ethylen Aerenchymbildung im Internodium und eine erhöhte Porosität des jüngsten Knotens. Als weitere Signale im aerenchymalen Zelltod wurden reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxidanion-Radikal ($O_2^{\bullet-}$) identifiziert, wobei beide Spezies antagonistische Wirkungen zeigen. H_2O_2 ist in der Signaltransduktion Ethylen nachgeschaltet und induziert die Aerenchymbildung. $O_2^{\bullet-}$ hat einen inhibitorischen Effekt auf den Ethylen-induzierten Zelltodprozess.

Präaerenchymzellen im Reisinternodium besitzen im Vergleich zu den umliegenden Parenchymzellen keine Chloroplasten, weniger Stärke, eine große Zentralvakuole und dünnere Zellwände. In deren Zelldifferenzierung können heterotrimere G-Proteine eine Rolle spielen, da ein Defekt in der $G\alpha$ -Untereinheit zu einem Fehlen von charakteristischen Interzellularen im Präaerenchym führt. Während des Zelltods der Präaerenchymzellen degradiert die nukleosomale DNA. Die Mitochondrien der sterbenden Zellen weisen mit vergrößerten Cristae und kondensierter Matrix eine degenerierte Ultrastruktur auf. Eine vermehrte Aggregation der Mitochondrien deutet auf einen bevorstehenden Abbau der Organellen hin.

Summary

The semi-aquatic species rice (*Oryza sativa* L.) tolerates submergence and hypoxic conditions through morphological adaptations like aerenchyma formation in internodes. Submergence and ethylene promote aerenchyma formation in internodes and an increased porosity of the youngest node. In addition, reactive oxygen species like hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) were identified as signals of aerenchymal cell death. Both species display antagonistic effects. H_2O_2 acts downstream of ethylene and promotes aerenchyma formation and $O_2^{\bullet-}$ inhibits cell death induced by ethylene.

Preaerenchyma cells in rice internodes contain no chloroplasts, less starch, a large vacuole and thinner cell walls compared to surrounding parenchymal cells. Heterotrimeric G proteins may play a role in their cell differentiation process because a defect in the $G\alpha$ subunit leads to a lack of characteristic intercellulars between preaerenchyma cells. Nucleosomal DNA degrades in the cell death process. Mitochondria display changes in their ultrastructure with remodelled cristae and condensed matrix. Increased aggregation of mitochondria indicates forthcoming degradation of these organelles.

Einleitung

Morphologische Anpassungen von Reis an Überflutung

Reis (*Oryza sativa* L.) ist das Hauptnahrungsmittel für mehr als die Hälfte der menschlichen Bevölkerung (Huke, 1982). 2009 wurden in über 100 Ländern mehr als 700 Millionen Tonnen produziert (www.irri.org). Der Anbau erfolgt hauptsächlich im asiatischen Raum. Abiotische Stressfaktoren, wie Überflutung der Reisfelder oder Dürreperioden, sind in den meisten Anbaugebieten zu finden. So werden zum Beispiel die Felder in Thailand, Indien, Burma und Vietnam regelmäßig überflutet, wobei Wasserhöhen zwischen 30 Zentimetern bis zu einem Meter erreicht werden. In einigen Gebieten können auch Wasserhöhen erreicht werden, die zwei Meter überschreiten. Reis ist als einziges Getreide aufgrund spezieller morphologischer und metabolischer Anpassungen an Überflutungen in der Lage in diesen Regionen zu wachsen.

Ein Problem bei Überflutung ist die Sauerstoffverfügbarkeit in gefluteten Organen. Aufgrund der 10.000-fach verringerten Diffusionsgeschwindigkeit von Gasen wie Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff in Wasser im Vergleich zur Luft wird die Verfügbarkeit in gefluteten Organen der Pflanze stark eingeschränkt (Jackson, 1985). Reispflanzen benötigen, wie alle aeroben Organismen, in der Zellatmung Sauerstoff für die Energiegewinnung über Glykolyse, Oxidative Decarboxylierung, Citratcyclus und Atmungskette, die im Cytosol und in den Mitochondrien ablaufen. Hypoxische Bedingungen liegen vor, wenn die Sauerstoffkonzentration so weit absinkt, dass die ATP-Produktion der aeroben Atmung nicht mehr zur Versorgung der Stoffwechselprozesse ausreicht und durch anaerobe Prozesse gedeckt werden muss (Fukao und Bailey-Serres, 2004). Die im Folgenden beschriebenen morphologischen Anpassungen der semi-aquatischen Spezies Reis ermöglichen ein Überleben der Pflanze bei hypoxischen Bedingungen während der Überflutung.

Hormonelle Regulation des Streckungswachstums von Internodien

Evolutionär gibt es in den drei Ökotypen Hochland-, Flachland- und Tiefwasserreis zwei unterschiedliche Möglichkeiten zur Anpassung an Überflutung (Bailey-Serres und Voesenek, 2008; Voesenek und Bailey Serres, 2009). Überflutungs-tolerante Flachlandreis-Kultivare überdauern mehrere Wochen anhaltende Überflutung. Hierbei wird das Internodienwachstum inhibiert und der Metabolismus herunterreguliert. Dadurch werden wichtige Ressourcen wie ATP und Kohlenhydrate gespart. Tiefwasserreis- und einige Flachlandreis-Kultivare sind Überflutungs-intolerant. Bei intoleranten Kultivaren wird ein verstärktes Streckungswachstum des jüngsten Internodiums induziert und so die Sauerstoffverfügbarkeit erhöht. Diese Adaptation wird als *low oxygene escape syndrom* (LOES) bezeichnet. Tiefwasserreis kann in Wasserhöhen von vier Metern bis zu 25 Zentimeter pro Tag auf eine Gesamthöhe von bis zu sieben Meter wachsen (Kende *et al.*, 1998).

Die Vermeidung der hypoxischen Bedingungen bei Überflutung ist auch in anderen Spezies zu beobachten. *Arabidopsis thaliana* und *Rumex palustris* zeigen zum Beispiel hyponastisches Wachstum bei steigendem Wasserstand (Voesenek *et al.*, 2003; Millenaar *et al.*, 2005). In *Rumex palustris* wird darüber hinaus das Streckungswachstum der Petiolen induziert, wodurch die Pflanze aus dem Wasser hinauswächst. In *Rumex acetosa* fehlt dieses Streckungswachstum (Pierik *et al.*, 2009). Zusätzlich weisen Petiolen von *R. palustris* eine doppelt so hohe Porosität auf wie Petiolen von *R. acetosa*. Diese hohe Porosität ist eine Voraussetzung für erleichterte Gasdifusion in der Pflanze und dadurch kann in *R. palustris* durch die Elongation der Petiolen ein Gasaustausch mit der Atmosphäre stattfinden.

Die Elongationen des jüngsten Internodiums in Reis und der Petiolen in *Rumex* wird durch das Phytohormon Ethylen induziert und durch Gibberellinsäure (GA) vermittelt (Raskin und Kende, 1984ab; Voesenek *et al.*, 2003). Aufgrund der verringerten Diffusion des gasförmigen Ethylens in Wasser (Jackson, 1985) und einer erhöhten Biosynthese akkumuliert

Ethylen in Reisinternodien (Métraux und Kende, 1983; Raskin und Kende, 1984a; Stünzi und Kende, 1989). Durch die Ethylen-Akkumulation wird die GA-Konzentration und -Responsivität erhöht, wodurch im interkalaren Meristem die Elongation und Teilung der Zellen angeregt wird und das Internodium wächst (Raskin und Kende, 1984b; Sauter und Kende 1992; Lorbiecke und Sauter, 1998). Eine Verstärkung der GA-Responsivität wird durch die Verringerung der Konzentration des GA-Antagonisten Abscisinsäure (ABA) erreicht (Hoffmann-Benning und Kende, 1992; Kende et al., 1998).

Epidermaler Zelltod und Adventivwurzelwachstum

Während der Überflutung ist die Sauerstoffdiffusion von der Luft in den Boden stark eingeschränkt. Aerobe Bakterien und chemische Oxidationsreaktionen führen zu einer schnellen Abnahme der Sauerstoffkonzentration (Liesack *et al.*, 2000). Aufgrund anaerober Bakterien und dem reduzierenden Milieu des sauerstoffarmen Bodens nimmt die Verfügbarkeit von Nährstoffen für die Pflanze ab. Als Konsequenz der Überflutung des Bodens stirbt das Hauptwurzelwerk ab. Sekundäre, sprossbürtige Wurzeln, wie zum Beispiel Adventivwurzeln, können das Hauptwurzelwerk ersetzen und reduzieren die Distanz, über die der Gasaustausch stattfinden muss. In Reis werden die Wurzelanlagen in der Entwicklung an jedem Knoten angelegt (Lorbiecke und Sauter, 1999). Ethylen induziert, GA fördert und ABA inhibiert das Wachstum der Adventivwurzeln (Mergemann und Sauter, 2000; Steffens *et al.*, 2006). Einem Auswachsen der Wurzeln geht kontrollierter Zelltod der Epidermiszellen über den Anlagen voraus, um eine Verletzung des Wurzelapikalmeristems zu vermeiden. Ethylen und der Druck der auswachsenden Wurzel auf die Epidermiszellen führen zum programmierten Zelltod (Steffens *et al.*, 2012). Der Ethylen-induzierte epidermale Zelltod wird durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt (Steffens und Sauter, 2009a).

In der Signaltransduktion des Ethylen- und ROS-vermittelten epidermalen Zelltods sind heterotrimere G-Proteine involviert (Steffens und Sauter, 2009b). G-Proteine lassen sich in extra-große, heterotrimere und kleine G-Proteine unterteilen. Kleine G-Proteine sind 20 bis 40 kDa große Proteine, die in der inaktiven Form Guanosindiphosphat (GDP) gebunden haben (Takai *et al.*, 2001). Durch ein Signal dissoziiert GDP und durch Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) geht das Protein meist durch Konformationsänderung in die aktive Form über. Für diesen Austausch ist ein GTP-Austauschfaktor (*guanosine triphosphate exchange factor*, GEF) verantwortlich. Das aktive G-Protein aktiviert ein Effektormolekül. Ein GTPase-aktivierendes Protein (*GTPase-activating proteins*, GAP) aktiviert die intrinsische GTPase-Aktivität, GTP wird zu GDP und P_i hydrolysiert und das G-Protein ist wieder inaktiv. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten, der $G\alpha$ -, der $G\beta$ - und der $G\gamma$ -Untereinheit (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2004; Temple und Jones, 2007). Bindung des Signalmoleküls an dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor führt zu einem Austausch des GDP mit GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit. Es kommt zur Separation der $G\alpha$ -Untereinheit von dem $G\beta\gamma$ -Dimer. $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ können Effektoren aktivieren und das Signal somit auf zellulärer Ebene übertragen. Beim epidermalen Zelltod in Reis wird die Signaltransduktion über die $G\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine vermittelt. Pflanzen mit einer verminderten Expression der $G\alpha$ -Untereinheit weisen reduzierten Ethylen- und ROS-induzierten Zelltod über den Wurzelprimordien auf (Steffens und Sauter, 2009b).

Aerenchyme in Blättern, Wurzeln und Internodien

Aerenchyme sind gasgefüllte Räume, die die Diffusion von Gasen über weite Strecken vermitteln. Aerenchyme werden konstitutiv angelegt und sind auch eine Anpassung an Überflutung. So werden zum Beispiel im Rhizom von *Phragmites australis* (Armstrong *et al.*, 1988), in Blättern und im Internodium von Reis (Arashi und Nitta, 1955; Parlanti *et al.*, 2011) und

in den Wurzeln von *Rumex palustris* (Voesenek *et al.*, 2006), Weizen (Trought und Drew, 1980), Mais (Drew *et al.*, 1981) und Reis (Kawai *et al.*, 1998) Aerenchyme konstitutiv gebildet oder durch Überflutung induziert. Wurzeln sind häufig hypoxischen Bedingungen zum Beispiel durch Staunässe oder durch erhöhte Lagerungsdichte der Bodenpartikel ausgesetzt. Terrestrische Pflanzen wie Weizen oder Mais können in Wurzeln Hypoxie-induziert Aerenchyme ausbilden (Trought und Drew, 1980; Drew *et al.*, 1981). Der Wurzelbau ist für die mechanischen Eigenschaften von Bedeutung. Bei Erhöhung der Porosität durch Aerenchyme nimmt gleichzeitig die mechanische Stabilität der Wurzel ab (Striker *et al.*, 2007). In *Paspalidium geminatum* wird ein mehrschichtiger Ring aus dichtgepackten Zellen und Sklerenchymzellen im äußeren Kortex ausgebildet. Dadurch wird eine ausreichende mechanische Stabilität der Wurzel auch bei hoher Porosität erreicht. Auch in den Stängeln von Reispflanzen befindet sich unter der Epidermis ein mehrzelliger Ring an Sklerenchymzellen, die der Pflanze eine hohe Stabilität verleihen (Li *et al.*, 2003).

Die Bildung von Aerenchymenten erfolgt schizogen oder lysigen (Evans, 2003). Bei der schizogenen Aerenchymentbildung separieren sich Zellen durch unterschiedliches Wachstum, wodurch ein Hohlraum gebildet wird. Diese Aerenchymentwicklung kommt zum Beispiel in Wurzeln von *Rumex palustris* (Voesenek *et al.*, 2006) und *Avicennia marina* (Purnobasuki und Suzuki, 2005) vor. Eine Variante der schizogenen ist die rhexigene Aerenchymentbildung. Hierbei zerreißen die Zellen durch ungleiches Wachstum. In Wurzeln von Weizen (Trought und Drew, 1980), Mais (Drew *et al.*, 1981), *Juncus effusus* (Visser und Bögemann, 2006) und Reis (Kawai *et al.*, 1998) entwickeln sich die Aerenchyme lysigen, das heißt durch programmierten Zelltod. Dadurch wird nicht nur die Gasdiffusion im Gewebe erleichtert, sondern auch die Anzahl an Zellen reduziert, die Ressourcen wie Energie, Nährstoffe und Sauerstoff konsumieren (Drew *et al.*, 2000).

Die reduzierte Zellzahl in Organen, in denen sich Aerenchyme lysigen gebildet haben, hilft der Pflanze nicht nur bei Überflutung, sondern auch bei Trockenstress zu überleben (Zhu *et al.*, 2010). Es konnte eine erhöhte Trockenstress-Toleranz in Mais nachgewiesen werden, wenn die Wurzeln eine erhöhte Aerenchymbildung aufwiesen. Durch die verringerte Anzahl an Zellen, und den damit verringerten metabolischen Kosten, war das Wurzelwachstum erhöht und die Wasser- und Nährstoffaufnahme aus tieferen Erdschichten möglich.

In Reiwurzeln beginnt Aerenchymbildung in den Zellen des Kortex, die einen größeren Durchmesser haben (Kawai *et al.*, 1998). In den Zellen kommt es zum Verlust der Tonoplasten-Integrität und es gelangen Protonen aus der Vakuole ins Cytoplasma. Nachfolgend zerreißt die Plasmamembran und die Zelle kollabiert. Über die Plasmodesmata wird das Signal an die umliegenden Zellen übertragen und der programmierte Zelltod breitet sich in radialer Richtung weiter aus. Erste Hinweise auf die Plasmodesmata-vermittelte Weiterleitung des Zelltod-Signals lieferten van der Weele *et al.* (1996) bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Maiswurzeln.

Die Aerenchymentwicklung in Wurzeln von Mais (Drew *et al.*, 1981) und Reis (Justin und Armstrong, 1991b) ist Ethylen-abhängig. In *Juncus effusus*, die auf Feuchtgebiete spezialisiert ist, ist diese Ethylen-unabhängig (Visser und Bögemann, 2006).

Über pharmakologische Experimente in Maiswurzeln wurden neben Ethylen weitere Komponenten des aerenchymalen Zelltods identifiziert (He *et al.*, 1996b). Das Ethylensignal wird über G-Proteine vermittelt und die intrazelluläre Calcium-Konzentration wird erhöht. Der *second messenger* Calcium induziert eine Zunahme der Cellulase-Aktivität und damit den Abbau der Zellwände. Weiterhin sind in der Signaltransduktion ROS involviert (Yamauchi *et al.*, 2011).

Das Phytohormon Ethylen

Das gasförmige Phytohormon Ethylen ist in viele physiologische Prozesse, wie zum Beispiel dem vegetativen Wachstum, der Seneszenz und der Fruchtreife involviert (Smalle und van der Straeten, 1997; Cara und Giovannoni, 2008; Yoo *et al.*, 2009). Auch morphologische Anpassungen von Reis an Überflutung werden durch Ethylen induziert.

Ethylen-Biosynthese und Überflutung

In Reis akkumuliert Ethylen aufgrund der verminderten Diffusion und der erhöhten Biosynthese bei Überflutung. Ethylen wird aus S-Adenosylmethionin (SAM) gebildet (Rzewuski und Sauter, 2008). Die Aminosäure Methionin wird durch Reaktion mit ATP durch SAM-Synthase aktiviert. 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC) wird durch die Umwandlung von SAM durch die ACC-Synthase (ACS) gebildet (Adams und Yang, 1979). Dabei entsteht als weiteres Produkt 5'-Methylthioadenosin, das über den Yang-Zyklus zu Methionin recycelt wird (Miyazaki und Yang, 1987). Die ACS-Aktivität nimmt bei Hypoxie in Mais (He *et al.*, 1996a) und Reis (Cohen und Kende, 1987) zu. In Reis ist die Erhöhung nach zwei Stunden Überflutung oder Hypoxie messbar und erreicht ihr Maximum nach vier Stunden Behandlung. Die höchste Aktivität konnte in Tiefwasserreis im interkalaren Meristem und in der Elongationszone des jüngsten Internodiums gemessen werden. Zarembinski und Theologis (1993) zeigten in Reis eine Erhöhung der Expression der ACS nicht nur bei Anoxie, sondern auch durch das Phytohormon Auxin. Dies deutet darauf hin, dass Auxin die Ethylen-Biosynthese beeinflusst.

In einem zweiten Syntheseschritt wird ACC mit molekularem Sauerstoff zu Ethylen, Kohlenstoffdioxid und Blausäure durch die ACC-Oxidase (ACO) umgesetzt. Die ACO-Aktivität wird durch CO₂ erhöht (Fernandez-Maculet *et al.*, 1993; Poneleit und Dilley, 1993). Durch die verringerte Diffusion von Gasen in Wasser und der Bildung von CO₂ bei der Umsetzung von ACC akkumuliert CO₂ in der Pflanze. Dadurch wird die ACO-Aktivität gesteigert.

Auch die Transkription der *ACO* wird durch Überflutung gefördert (Mekhedov und Kende, 1996).

Perzeption und Transduktion des Ethylensignals

Komponenten der Ethylenperzeption und der Signaltransduktion wurden in *Arabidopsis thaliana* und entsprechende Homologe in Reis identifiziert (Rzewuski und Sauter, 2008). In Reis wurden ETHYLEN RESPONSE 2 (*ETR2*), *ETR3*, *ETR4*, ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 (*ERS1*), *ERS2* und *ETR2-like 1* (*ERL1*) als sechs putative Ethylenrezeptoren beschrieben (Watanabe *et al.*, 2004; Yau *et al.*, 2004). Die Transkription der einzelnen Rezeptoren ist gewebespezifisch und von abiotischen Faktoren wie Belichtung abhängig. So wird zum Beispiel *ETR2* stärker in etiolierten Keimlingen als in vegetativem, photosynthetisch aktivem Gewebe transkribiert. *ERS1* wird hingegen konstitutiv in der gesamten Pflanze exprimiert (Yau *et al.*, 2004). Die Transkription von *ERL1* wird durch Überflutung, Ethylen und GA in Tiefwasserreis gefördert (Watanabe *et al.*, 2004).

Die Rezeptoren besitzen drei bis vier hydrophobe Domänen, die die Lokalisation an Membranen und die Bindung von Ethylen ermöglichen. In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor *ETR1* an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Chen *et al.*, 2002) und Ähnlichkeiten mit einem bakteriellen Zwei-Komponenten-Regulator aufweist (Chang *et al.*, 1993). Ethylenrezeptoren sind negative Regulatoren (Hua und Meyerowitz, 1998, Wang *et al.*, 2006), die ohne Ethylen die MAPK-Kinase-Kinase CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (*CTR1*) binden und aktivieren (Kieber *et al.*, 1993; Kendrick und Chang, 2008; Yoo *et al.*, 2009). *CTR1* ist ebenfalls ein negativer Regulator und inhibiert in der aktiven Form ETHYLENE INSENSITIVE2 (*EIN2*). *EIN2* ist eine Schlüsselkomponente der Signaltransduktion und weist Ähnlichkeiten zu Ionen transportern der *Nramp*-Familie auf (Alonso *et al.*, 1999). So sind *ein2*-Mutanten Ethylen-insensitiv. Durch Bindung von Ethylen an den Rezeptor wird *CTR1* inaktiviert und *EIN2* aktiviert. Durch die Aktivierung von *EIN2* akkumulieren die Transkriptionsfaktoren *EIN3* und *EIN3-LIKE*

(EIL) in Arabidopsis. Die Akkumulation der Transkriptionsfaktoren wird durch Stabilisierung der Proteine über spezifische Phosphorylierungen durch eine MAP-Kinase-Kaskade erreicht (Kendrick und Chang 2008; Yoo *et al.*, 2008 und 2009). Ohne Ethylen werden EIN3 und EIL durch das 26S-Proteasom abgebaut. In Reis konnten sechs EILs identifiziert werden. EIL1 aus Reis konnte eine *ein3*-Mutation in Arabidopsis komplementieren und eine Überexpression in Reis führte zu einer verstärkten Ethylenantwort (Mao *et al.*, 2006). Dadurch konnte gezeigt werden, dass EIL1 aus Reis in die Ethylensignaltransduktion involviert ist und die Transkription von spezifischen Transkriptionsfaktoren, den Ethylen-responsiven Faktoren (ERFs) aktiviert.

In Reis gibt es 139 ERFs, die zur APETALA2/ERF-Superfamilie gehören (Nakano *et al.*, 2006). Einige Ethylen-induzierte morphologische und metabolische Anpassungen an Überflutung werden von ERFs der Gruppe VII vermittelt (Voesenek und Bailey-Serres, 2009). In Überflutungs-intolerantem Tiefwasserreis wird durch Ethylen die Expression der Gruppe VII ERFs *SNORKEL1* (*SK1*) und *SK2* induziert (Hattori *et al.*, 2009). Durch die Expression von *SK1* und *SK2* wird die GA-Biosynthese und -Responsivität erhöht. Hierbei spielt auch der polygenetische *SUBMERGENCE1*-Lokus (*SUB1*-Lokus) eine Rolle. In Tiefwasserreis sind *SUB1B* und *SUB1C* vorhanden (Fukao *et al.*, 2006; Fukao und Bailey-Serres, 2008). Die Transkription von *SUB1C* wird durch Ethylen und GA induziert. Über *SUB1C* wird die GA-induzierte Elongation des jüngsten Internodiums vermittelt.

In Überflutungs-tolerantem Flachlandreis wird *SUB1A* durch Überflutung hochreguliert und die Transkription von *SUB1C* verhindert (Fukao und Bailey-Serres, 2008; Voesenek und Bailey-Serres, 2009; Fukao *et al.*, 2011). Die Expression von *SUB1A* führt zu einer Akkumulation der GA-Signalrepressoren SLENDER RICE1 (SLR1) und SLR1 LIKE-1 (SLRL1). Die DELLA-Proteine SLR1 und SLRL1 unterdrücken die GA-Antwort durch verringerte GA-induzierte Gen-Expression, wie zum Beispiel von *SUB1C*.

Dadurch wird das Wachstum der Pflanze inhibiert und der Kohlenhydratverbrauch verringert.

SUB1A ist daneben für metabolische Anpassungen von Reis an Überflutung verantwortlich. Durch die hypoxischen Bedingungen während der Überflutung wird die aerobe ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung eingeschränkt. Bei der Glykolyse entstehen bei der Umsetzung von einem Molekül Glukose zwei Moleküle ATP. Dabei wird der Cofaktor NAD⁺ zu NADH reduziert. Durch oxidative Decarboxylierung, Citratcyklus und Atmungskette werden weitere 34 Moleküle ATP gebildet und NADH wird reoxidiert. Unter anaeroben Bedingungen wird NADH in der alkoholischen Gärung durch das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) als Reduktionsmittel verwendet und damit oxidiert. Dadurch wird die ATP-Produktion unter Sauerstoffmangel aufrechterhalten. Es entstehen allerdings nur zwei Moleküle ATP pro Molekül Glukose in der Glykolyse. Die Aktivität der ADH wird durch Sauerstoffmangel in der Reispflanze erhöht (Xie und Wu, 1989; Kato-Noguchi und Morokuma, 2007; Agarwal *et al.*, 2007), wobei die Aktivitätserhöhung in SUB1A-Kultivaren stärker ist (Fukao *et al.*, 2006).

In *Arabidopsis thaliana* wurde für RAP2.12, ein ERF der Gruppe VII, die Funktion als Sauerstoffsensoren nachgewiesen (Gibbs *et al.*, 2011; Licausi *et al.*, 2011). RAP2.12 wird konstitutiv ubiquitär exprimiert und ist durch Bindung an Acyl-CoA-bindenden Proteinen (ACBP) an der Plasmamembran lokalisiert. Durch Hypoxie dissoziiert dieser Komplex und RAP2.12 gelangt in den Zellkern, wodurch Hypoxie-relevante Gene transkribiert werden. Durch Wiederherstellung von normoxischen Bedingungen wird RAP2.12 in dem *N-end rule pathway* abgebaut und die Hypoxie-Antwort endet. Bei der Degradierung des Proteins ist deren N-Terminus entscheidend. Das terminale Methionin wird durch eine Methionin-Aminopeptidase entfernt. Die zweite Aminosäure in RAP2.12 ist Cystein. Dieses Cystein wird durch Sauerstoff oxidiert und eine Arginintransferase konjugiert ein Arginin an das oxidierte Cystein. Dadurch wird die Ubiquitinierung und nachfolgende Degradierung des Proteins

ausgelöst. In Reis wurde bisher noch keine Sauerstoff-abhängige Degradierung von ERFs über den *N-end rule pathway* beobachtet, obwohl zum Beispiel SUB1A dasselbe Motiv am N-Terminus trägt wie RAP2.12.

Die Rolle von Gibberellin, Abscisinsäure und Auxin in der Hypoxie-Antwort

Gibberelline sind tetracyclische Diterpene, die zum Beispiel in der Samenkeimung und der Blütenentwicklung eine Rolle spielen (Schwechheimer, 2008). Gibberelline werden im Methylerythritol-Phosphat-Weg in Plastiden gebildet und im endoplasmatischen Retikulum und Cytosol modifiziert (Hedden und Thomas, 2012). Durch Bindung von GA interagiert der Rezeptor GA INSENSITIVE DWARF1 (GID1) mit DELLA-Proteinen, wodurch die Degradierung dieser Repressoren durch eine E3-Ubiquitin-Ligase induziert wird (Schwechheimer, 2008). Durch Abbau der DELLA-Proteinen wird die Transkription GA-spezifischer Gene ermöglicht. GA-vermittelte Anpassungen an Überflutung sind zum Beispiel das Streckungswachstum der Petiolen in *Rumex palustris* (Voeselek *et al.*, 2003) und das Wachstum des jüngsten Internodiums (Kende *et al.*, 1998) und der Adventivwurzeln (Steffens *et al.*, 2006) in Reis.

Abscisinsäure ist zum Beispiel in der Samenruhe, dem vegetativen Wachstum und in Trockenstress-Antworten involviert (Xiong und Zhu, 2003). Die Biosynthese erfolgt in Plastiden und Cytosol aus Carotinoiden. Bindung von ABA an Rezeptoren wie zum Beispiel der REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR/PYRABACTIN RESISTANCE PROTEIN1/PYR-Like Proteinen (RCARs/PYR1/PYLs) führt zur Interaktion des Rezeptors mit Serin/Threonin-Phosphatasen des Typs 2C (PP2C) (Raghavendra *et al.*, 2010; Ben-Ari, 2012). PP2C dephosphoryliert im ungebundenen Zustand Kinasen der Superfamilie SUCROSE-NONFERMENTING KINASES (SNFs). Gebunden unterbleibt die Dephosphorylierung und die Kinasen phosphorylieren weitere Proteine wie Transkriptionsfaktoren oder Ionenkanäle. In der Anpassung an Überflutung ist ABA häufig ein Antagonist der GA-vermittelten Effekte. So

kann ABA die Elongation des jüngsten Internodiums (Kende *et al.*, 1998) oder das Auswachsen von Adventivwurzeln (Steffens *et al.*, 2006) in Reis inhibieren.

Auxin ist in der Entwicklung von Wurzel, Stängel, Blatt und Blüten involviert (McSteen, 2010). Auxine besitzen ein aromatisches Ringsystem mit einem hydrophoben Rest und einer Carboxyl-Gruppe (Korasick *et al.*, 2013). Als Aromat können Indol-, Phenyl- und Naphthyl-Gruppen auftreten. Das am besten untersuchte natürliche Auxin ist Indol-3-essigsäure (IAA), welches sowohl abhängig als auch unabhängig von Tryptophan gebildet wird (Vanneste und Friml, 2009; McSteen, 2010; Korasick *et al.*, 2013). In Pflanzen scheinen nur die Tryptophan-abhängigen Synthesen über den Tryptamin-Weg (TAM) und Indol-3-Pyruvat-Weg (IPA) von Bedeutung zu sein.

Auxin kann über das Phloem über weite Strecken transportiert werden. Polarer Auxintransport tritt im Gewebe auf (Friml und Palme, 2002; Feraru und Friml, 2008; Vanneste und Friml, 2009). Aufgrund seines pKs-Werts von 4,6 bis 4,75 liegt IAA bei einem niedrigem pH von 5,5 im Apoplasten protoniert als IAAH vor (Rubery und Sheldrake, 1973; Friml und Palme, 2002). IAAH ist lipophiler und kann durch die Plasmamembran in die Zelle diffundieren. Darüber hinaus gibt es Auxin-Influx-Carrier (AUX1/LAX-Familie), die zum Beispiel im Spross an der apikalen Seite der Plasmamembran lokalisiert sind. Innerhalb der Zelle deprotoniert IAAH aufgrund des neutralen pH und IAA⁻ ist in der Zelle eingeschlossen. Durch Auxin-Efflux-Carrier der PIN-Familie wird IAA⁻ an der basalen Plasmamembran in den Apoplast transportiert. Durch Lokalisation der PIN-Proteine an der basalen Membran wird ein polarer Transport des Auxins möglich. Auxin bindet an den Rezeptor TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1). TIR1 codiert ein F-Box-Protein. Die Weiterleitung des Auxin-Signals beruht auf Degradierung von Repressoren über den SCF^{TIR1}-Komplex (Paclorek und Friml, 2006; Vanneste und Friml, 2009). Ohne Auxin binden die Repressoren der AUX/IAA-Familie an Transkriptionsfaktoren, den AUXIN RESPONSE

FACTORS (ARFs). Durch Erhöhung der Auxin-Konzentration wird AUX/IAA ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom abgebaut. Daraufhin werden Auxin-responsive Gene transkribiert.

In der Anpassung an Überflutung und Hypoxie kann Auxin über die Erhöhung der Ethylen-Biosynthese eine Rolle spielen (Yang und Hoffman, 1984). Dies konnte in Mungbohnen und Erbsen-Keimlingen beobachtet werden. Die Entwicklung von Adventivwurzelnanlagen in Reis wird durch den ARF ADVENTITIOUS ROOTLESS1 (ARL1) reguliert (Liu *et al.*, 2005). Dieses LOB-Domänen enthaltene Protein ist wichtig für die Anlage von Adventivwurzeln, wie Mutantanalysen mit *arl1*-Pflanzen zeigen. Die Auxinkonzentration ist entscheidend bei der Aerenchymbildung in Maiswurzeln. Konings und de Wolf (1984) beobachteten eine Inhibition der Aerenchymentwicklung durch Behandlung von Maiswurzeln mit 100 nM bis 10 µM des synthetischen Auxins 1-Naphthyllessigsäure (1-NAA). Justin und Armstrong (1991a) zeigten, dass geringere Auxin-Konzentrationen zwischen 10 nM und 1 nM die Aerenchymbildung in Maiswurzeln förderten.

Rolle von ROS bei der Antwort auf Überflutung

ROS sind Sauerstoff-Radikale wie Superoxidanion-Radikale ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxyl-Radikale ($^{\bullet}OH$), Perohydroxyl-Radikale (HO_2^{\bullet}) und Alkoxy-Radikale (RO^{\bullet}) und auch Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und Ozon (O_3) (Blokhina *et al.*, 2003; Gill und Tuteja, 2010; Suzuki *et al.*, 2011). ROS entstehen als Nebenprodukt im aeroben Metabolismus und werden in Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxysomen gebildet. In Chloroplasten kann Sauerstoff während der Photosynthese Elektronen aufnehmen und $O_2^{\bullet-}$ bilden. Die Elektronentransportkette in den Mitochondrien ist eine weitere Quelle, um Sauerstoff zu reduzieren. Es wird vermutet, dass circa 1% bis 5% des durch die Mitochondrien konsumierten Sauerstoffs zu ROS umgesetzt werden (Møller, 2001). In Peroxysomen finden zum Beispiel die Photorespiration und die β -Oxidation von Fettsäuren statt. Diese

oxidativen Reaktionen sind eine weitere Quelle von ROS. Ein anderer Entstehungsort von ROS ist die Membran-lokalisierte NADPH-Oxidase, die Elektronen von NADPH auf O_2 überträgt und $O_2^{\bullet-}$ bildet.

ROS sind hochreaktiv und können der Zelle erheblich schaden (Gill und Tuteja, 2010). Radikale können zum Beispiel mit ungesättigten Fettsäuren reagieren. Die dadurch entstehenden Alkyl-Radikale reagieren wiederum mit weiteren Fettsäuren. Diese Kettenreaktion endet mit Bildung von Fettsäuredimeren, die entweder direkt oder über eine Peroxidbrücke verbunden sind. Als Folge kann die Fluidität der Membran abnehmen, die Durchlässigkeit erhöht und Membranproteine beschädigt werden. Während der Reaktion entstandene Aldehyde haben das Potential, mit DNA und Proteinen zu konjugieren und dadurch deren Funktion zu beeinträchtigen. Als weitere Reaktionen von ROS können Proteine und DNA direkt oxidiert werden. Oxidierte Proteine können zum Beispiel in der Matrix von Mitochondrien von Reisblättern nachgewiesen werden (Kristensen *et al.*, 2004)

Aerobe Organismen haben durch Antioxidantien Möglichkeiten die Schädigung durch ROS zu vermindern (Blokina *et al.*, 2003; Gill und Tuteja, 2010; Kar, 2011). Es gibt enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien. Zu den enzymatischen zählen unter anderem die Superoxid-Dismutase (SOD), die $O_2^{\bullet-}$ in H_2O_2 überführt, die Katalase, die die Reaktion von H_2O_2 zu H_2O und O_2 katalysiert, und die Ascorbat-Peroxidase, die ebenfalls H_2O_2 entgiftet. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen Ascorbinsäure, Glutathion und Metallothioneine (MT). Diese können mit ROS reagieren, wodurch unkontrollierte Oxidationen in der Zelle verhindert werden.

In der Zelle herrscht ein Gleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von ROS (Blokina *et al.*, 2003; Gill und Tuteja, 2010; Kar, 2011). Viele biotische und abiotische Stressfaktoren wie Pathogene, UV-Stress, Trockenstress, und Hypoxie, können zu einer Akkumulation von ROS führen. Die Signalweiterleitung durch ROS ist sehr variabel (Mittler *et al.*, 2011). Die Konzentrationen können durch Synthese und Abbau in jeder

Zelle und in verschiedenen Kompartimenten unterschiedlich sein. Dadurch werden lokale Reaktionen hervorgerufen oder das Signal über weite Strecken von Zelle zu Zelle wellenartig transportiert. Durch die verschiedenen Spezies können unterschiedliche Antworten hervorgerufen werden (Mittler *et al.*, 2011).

ROS vermitteln zum Beispiel Samenkeimung (Müller *et al.*, 2009), Pollenschlauch-Wachstum (Potocký *et al.*, 2007) und Zellelongation in Arabidopsiswurzeln (Foreman *et al.*, 2003). Auch in der morphologischen Anpassung von Reis und Mais an Überflutung spielen ROS eine Rolle. So wird das Ethylen-induzierte Adventivwurzelwachstum in Reis über ROS vermittelt (Steffens und Sauter, 2009a; Steffens *et al.*, 2012). Zelltodprozesse wie der epidermale Zelltod über den Wurzelanlagen kann durch Herunterregulierung des nicht-enzymatischen ROS-Fängers MT2b gefördert werden (Steffens und Sauter, 2009a). In der Aerenchymbildung der Maiswurzel sind ROS ebenfalls in die Signaltransduktion involviert (Yamauchi *et al.*, 2011). Hier ist die Expression der Plasmamembranständigen NADPH-Oxidase RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG (RBOH) während der Überflutung erhöht und die eines MT reduziert. Das führt zu einer Akkumulation von ROS in der Wurzel. Inhibierung der NADPH-Oxidase führte zur Inhibition des aerenchymalen Zelltods. Die Aerenchymbildung in der Maiswurzel ist ROS-vermittelt.

Zelluläre Charakteristika von Zelltodprozessen *in planta*

Programmierter Zelltod ist eine Antwort auf abiotischen oder biotischen Stress und während der Pflanzenentwicklung von Bedeutung (Rogers, 2005). In der Blatt-, Stängel- und Wurzelentwicklung sind Zelltodprozesse involviert. Zum Beispiel wird die gitterartige Struktur der Blätter von *Aponogeton madagascariensis* durch programmierten Zelltod gebildet (Gunawardena *et al.*, 2004). Durch Stressfaktoren können darüber hinaus weitere Zelltodprozesse ausgelöst werden. Beispielsweise sterben während der hypersensitiven Reaktion bei Befall von Tabakblättern mit dem Tabakmosaikvirus infizierte und umliegende Zellen ab, um das

Pathogen an der Replikation zu hindern und eine Ausbreitung zu vermeiden (Mittler *et al.*, 1997).

Die im tierischen Organismus zu unterteilenden Zelltodprozesse Apoptose, Autophagie und Nekrose unterscheiden sich in zellulären und molekularen Charakteristika (Reape *et al.*, 2008). In Pflanzen ist eine solche Einteilung schwer, da in unterschiedlichen Spezies und in verschiedenen Geweben der Zelltod andere Merkmale aufweisen kann. So wurden Einteilungen in Apoptose-ähnlicher Zelltod und Nekrose (Reape *et al.*, 2008), in vakuolärer Zelltod und Nekrose (van Doorn *et al.*, 2011) und autolytischer und nicht-autolytischer Zelltod (van Doorn, 2011) vorgeschlagen. Allerdings waren die Einteilungen bisher oft unzureichend, da es immer Prozesse gab, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Es muss also für jeden Zelltodprozess analysiert werden, welche Vorgänge auf zellulärer Ebene in welcher zeitlichen Reihenfolge auftreten. Unterschiede bei kontrolliertem und unkontrolliertem Zelltod können zum Beispiel am Cytoplasma beobachtet werden. In vielen kontrollierten Zelltodprozessen kondensiert das Cytoplasma und die Plasmamembran löst sich von der Zellwand (Reape und McCabe, 2008; Reape *et al.*, 2008). Dies ist zum Beispiel beim Wärme-induzierten Zelltod von Zellen *Daucus carota*-Zellkulturen zu erkennen. Bei höheren Temperaturen und dem Eintreten von unkontrolliertem Zelltod sterben die Zellen ohne Veränderungen das Cytoplasmas. Weitere Veränderungen während des Zelltodprozesses können im Zellkern und den Mitochondrien beobachtet werden (Tabelle 1). Im Zellkern wird oft DNA abgebaut, um wichtige Ressourcen wie Stickstoff zu recyceln. Die Degradierung der DNA ist unter anderem bei Zelltodprozessen während der Blattentwicklung von *Aponogeton madagascariensis* (Gunawardena *et al.*, 2004; Lord *et al.*, 2011), bei der Samenkeimung in Weizen und Mais (Young und Gallie, 1999; Dominguez *et al.*, 2004) und der Aerenchymbildung in der Maiswurzel (Gunawardena *et al.*, 2001) zu beobachten. Während der Apoptose in tierischen Zellen wird Cytochrom c (Cyt c) aus Mitochondrien freigesetzt (Reape und McCabe, 2008; Reape *et al.*, 2008). Cyt c gelangt

ins Cytoplasma und fördert die Bildung eines Caspase-aktivierenden Komplexes, dem Apoptosom. Caspasen sind Proteasen und die Caspase-vermittelte Prozessierung spezifischer Zielproteine ist zum Beispiel der Auslöser der DNA-Fragmentierung (Fischer et al., 2003). Es gibt zwei Möglichkeiten, wie Cyt c in das Cytoplasma gelangt (Reape und McCabe, 2008). Entweder gelangt es durch einen Defekt der äußeren Mitochondrienmembran oder über einen Spannungs-abhängigen Anionenkanal in das Cytoplasma. Auch in *Arabidopsis thaliana* (Yao et al., 2004), Sonnenblume (Balk und Leaver, 2001) und Gurke (Balk et al., 1999) konnte eine Cyt c-Abgabe in das Cytosol vor dem auftretenden Zelltod gemessen werden (Tabelle 1). Weiterhin können Änderungen der Ultrastruktur, der Beweglichkeit und dem Transmembranpotential der Mitochondrien auftreten (Yao et al., 2004; Lord et al., 2011; Qi et al., 2011; Díaz-Tielas et al., 2012). Dies deutet auf den Verlust der Funktion und auf den Abbau der Mitochondrien hin.

Weitere Kennzeichen von Zelltod können zum Beispiel die Vergrößerung der Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums, Bildung von Vakuolen und der Abbau des Zellkerns und der Plastiden sein (Tabelle 1; Papini et al., 1999; Love et al., 2008; Reape und McCabe, 2008; Reape et al., 2008; Lord et al., 2011). Diese Merkmale treten zum Beispiel bei der Blattentwicklung von *Aponogeton madagascariensis* und der Degradierung des Tapetums in *Lobivia rauschii* und *Tillandsia albida* auf.

Tabelle 1: Zelluläre Charakteristika von Zelltodprozessen *in planta*.

Organell / Kompartiment	Mögliche Veränderungen während des Zelltodprozesses
Plasmamembran	Einschnürungen Defekte
Cytoplasma	Kondensation
Plastide	Abbau
Zellkern	DNA-Degradierung Abbau
Endoplasmatisches Retikulum	Vergrößerung der Zisternen
Tonoplast	Defekte
Vakuolen	Bildung lytischer Vakuolen
Mitochondrien	Cytochrom c-Freisetzung Änderung der Ultrastruktur Änderung der Mobilität Änderung des Transmembranpotentials Abbau

Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die konstitutive und die induzierte Aerenchymbildung in Internodien von Flachland- und Tiefwasserreis charakterisiert werden. Aerenchymbildung beruht auf programmiertem Zelltod von präaerenchymalen Zellen. Die Merkmale der Präaerenchymzellen sollten zytologisch untersucht und der Zelltod auf zellulärer Ebene analysiert werden. Ein weiteres Ziel war es, zelltodinduzierende Signale und mögliche Komponenten der Signaltransduktion zu identifizieren. Als weiteres Ziel sollte die Funktion der Aerenchyme als Durchlüftungsgewebe näher untersucht und mögliche weitere Funktionen aufgezeigt werden.

Kapitel 1

Aerenchymbildung in Reisinternodien ist Ethylen-induziert und H₂O₂-vermittelt

Lysigene Aerenchyme werden konstitutiv in Internodien der semi-aquatischen Pflanze Reis (*Oryza sativa* L.) sowohl in Flachlandreis als auch Tiefwasserreis gebildet. Die Aerenchymbildung ist Entwicklungsabhängig und in Tiefwasserreis werden mehr Aerenchyme konstitutiv angelegt im Vergleich zu Flachlandreis. Präaerenchymzellen besitzen im Gegensatz zu umliegenden Parenchymzellen eine dünnere Zellwand, keine Chloroplasten, weniger Stärke und eine große Zentralvakuole. Aerenchymbildung wird in Internodien durch Überflutung und Ethylen gefördert. Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Signaltransduktion der Aerenchymbildung involviert. Durch Ethylen wird vermehrt Superoxidanion-Radikal in Präaerenchymzellen gebildet. Wasserstoffperoxid fördert Aerenchymbildung Dosis-abhängig. Eine verminderte Expression des Wasserstoffperoxid-Fängers Metallothionein 2b erhöht die Überflutungs-abhängige Aerenchymentwicklung.

Von den in diesem Kapitel vorgestellten Arbeiten wurden von mir die Experimente und nachfolgende Aerenchymzählungen bei Überflutung, mit Ethephon und H₂O₂ durchgeführt. Desweiteren wurden von mir die Gewebefärbungen und die Superoxidanion-Radikal-Untersuchung angefertigt.

Aerenchyma formation in the rice stem and its promotion by H₂O₂

Bianka Steffens, Thomas Geske and Margret Sauter

Physiologie und Entwicklungsbiologie der Pflanzen, Botanisches Institut, Universität Kiel, Am Botanischen Garten 5, 24118 Kiel, Germany

Summary

Author for correspondence:
Margret Sauter
Tel: +49 431 8804210
Email: msauter@bot.uni-kiel.de

Received: 2 August 2010
Accepted: 1 September 2010

New Phytologist (2010)
doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03496.x

Key words: aerenchyma, ethylene, hydrogen peroxide (H₂O₂), MT2b, *Oryza sativa* (rice), oxygen radical, reactive oxygen species.

- Gas spaces (aerenchyma) form as an adaptation to submergence to facilitate gas exchange. In rice (*Oryza sativa*), aerenchyma develop by cell death and lysis, which are poorly understood at the cellular level.
- Aerenchyma formation was studied in rice stems by light microscopy. It was analyzed in response to submergence, ethylene and hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment, and in the *MT2b::Tos17* mutant. O₂^{•-} was detected with nitroblue tetrazolium and an epinephrine assay. H₂O₂ was detected with 3,3'-diaminobenzidine.
- Aerenchyma develop constitutively in all internodes of the deep-water rice variety Pin Gaew 56, but are absent from the nodes. Constitutive aerenchyma formation was also observed in two lowland rice varieties, albeit to a lesser degree. A larger number of aerenchyma are present in older internodes, and at the top of each internode, revealing developmental gradients. Submergence or treatment with the ethylene-releasing compound ethephon promoted aerenchyma formation in all genotypes analyzed. Pre-aerenchymal cells contain less starch, no chloroplasts, thinner cell walls and produce elevated levels of O₂^{•-} and H₂O₂ compared with other parenchymal cells. Ethephon promotes O₂^{•-} formation and H₂O₂ promotes aerenchyma formation in a dose-dependent manner. Furthermore, genetic downregulation of the H₂O₂ scavenger MT2b enhances aerenchyma formation.
- Aerenchyma formation is mediated by reactive oxygen species.

Introduction

Plants are aerobic organisms and a lack of oxygen presents a severe stress. Low oxygen conditions in plants can be brought about by high metabolic activity, soil waterlogging or flooding. Soil waterlogging and flooding are environmental conditions that are frequently encountered by plants growing in aquatic or semi-aquatic habitats. Plant roots are most often exposed to a lack of oxygen as gas exchange is strongly decreased in waterlogged soils. However, when plant shoots become flooded, they also experience oxygen shortage. The problem of oxygen supply becomes more severe in turbid waters or with deep floods, which cause low light conditions that prevent photosynthetic oxygen production. Plants, such as rice (*Oryza sativa*), endure frequent flooding by adaptations found not only in roots, but also in stems. One basic strategy to cope with flooding is to improve gas exchange. Gas-filled spaces

(aerenchyma) are constitutively found in aquatic and semi-aquatic plants, and are considered to be an efficient mechanism to ameliorate low oxygen stress. Aerenchyma facilitate gas exchange between aerial and submerged plant parts by reducing the diffusion resistance to gas exchange imposed by cells.

Aerenchyma can form by lysigeny or schizogeny. Lysigenous aerenchyma formation is observed in rice or maize roots, where cortex cells undergo programmed cell death. Subsequently, the cell corpses, including the cell walls, are degraded and resorbed, resulting in a gas space (Kawai *et al.*, 1998; Evans, 2003). Aerenchyma form along the length of a plant organ, such as the root. In rice, they are also present in stems and leaves (Arashi & Nitta, 1955; Matsukura *et al.*, 2000; Colmer & Pedersen, 2008). In wetland species, such as *Sagittaria lancifolia* and rice, which are well adapted to frequent flooding, aerenchyma develop constitutively (Raskin & Kende, 1983; Webb & Armstrong,

1983; Schussler & Longstreth, 1996). However, there is large variation in the development of adaptive traits, even among different rice cultivars (Fukao *et al.*, 2006; Hattori *et al.*, 2009).

Ethylene has been identified as the hormonal signal that mediates aerenchyma formation in wheat, maize, rice and *Arabidopsis* (Drew *et al.*, 1981; Konings, 1982; Jackson *et al.*, 1985; Justin & Armstrong, 1991; He *et al.*, 1996; Watkin *et al.*, 1998; Gunawardena *et al.*, 2001; Mühlenbock *et al.*, 2007; Shiono *et al.*, 2008), whereas, in *Juncus effuses*, root aerenchyma form independent of ethylene (Visser & Bögemann, 2006). The diffusion rate of the gaseous hormone ethylene is greatly reduced on submergence, resulting in rapid accumulation in submerged tissues. Although the ethylene signaling pathway has been elucidated in detail, molecular events that result in the induction and execution of programmed cell death during aerenchyma formation are less well understood. In the maize root, Ca^{2+} , protein phosphorylation and G-protein signaling appear to be integral signal components, as reagents that increase cytosolic Ca^{2+} , protein phosphatase inhibitors and constitutive activation of G-protein promote aerenchyma formation at normoxic conditions (He *et al.*, 1996). In rice roots, cell death has been shown to begin with the largest cell in the mid-cortex and to expand radially to neighboring cells (Kawai *et al.*, 1998).

Programmed cell death is a developmental program that is indispensable for plant development, and represents an important strategy of plants for adaptation to biotic and abiotic stresses. The hypersensitive response (HR) describes local cell death in response to pathogen attack and helps to limit the spread of the pathogen (Zurbriggen *et al.*, 2010). Epidermal cell death precedes the emergence of adventitious roots at the nodes of submerged rice plants. As is the case with aerenchymal cell death, epidermal cell death is induced by ethylene (Mergemann & Sauter, 2000). Hydrogen peroxide (H_2O_2) has been shown recently to act as a signal that is required for ethylene-induced epidermal cell death and is sufficient to promote it (Steffens & Sauter, 2005, 2009). Reactive oxygen species (ROS) have also been recognized as important signaling molecules in the hypersensitive cell death response (Lamb & Dixon, 1997). HR is characterized by an oxidative burst during which high levels of H_2O_2 are produced.

In this study, we analyzed aerenchyma formation in the rice stem. Based on the hypothesis that parenchymal cell death may be accompanied by ROS production, we analyzed the presence of H_2O_2 and the superoxide anion radical (O_2^-) in the rice stem. Furthermore, we pursued the question of whether an increase in H_2O_2 would be sufficient to induce parenchymal cell death and thus promote aerenchyma formation. In addition to H_2O_2 treatment, we employed a rice mutant with an insertional mutation in the *MT2b* gene, which encodes a metallothionein. In rice sus-

pension cells, constitutive genetic downregulation of *MT2b* transcript levels resulted in the accumulation of H_2O_2 , showing that *MT2b* acts as a ROS scavenger (Wong *et al.*, 2004). In addition, both hypersensitive cell death and epidermal cell death were enhanced in the *MT2b::Tos17* mutant (Wong *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2008; Steffens & Sauter, 2009). The data provided in this study show that aerenchyma formation is also controlled by H_2O_2 , indicating that ROS play a key role in the regulation of diverse cell death processes in rice.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

Seeds of *Oryza sativa* L., deep-water rice cv Pin Gaew 56 (PG56; indica rice) were cultivated. Stem sections were prepared from 11–14-wk-old plants from 20 mm below the basal node of the first, second or third internode with a total length of 200 mm, as described previously (Sauter, 1997). Seeds of the lowland rice cultivars Kinmaze (japonica rice), Nipponbare (japonica rice) and the *MT2b::Tos17* line in the Nipponbare background were imbibed in 50 μM *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), a nitric oxide (NO)-releasing compound, to increase germination rates. Stem sections were excised from 18–20-wk-old plants. For the treatment with H_2O_2 , stem sections were excised 5 mm below the lower node and had a total length of 185 mm. Up to 15 stem sections were placed in a 150-ml beaker containing 20 ml of an aqueous solution of 150 μM ethephon (2-chloroethanephosphoric acid; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) or 50 ml of H_2O_2 (Roth, Karlsruhe, Germany) at the concentrations indicated. Plastic cylinders covered the beakers to ensure high humidity. For submergence treatment, plants were partially submerged in a 600-l plastic tank filled with tap water with *c.* 300 mm of the leaf tips remaining above the surface. Plants were grown and stem sections were incubated in a growth chamber at 27°C at 70% relative humidity and 16 h light at 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Analysis of aerenchyma in the stem

For microscopic analyses, internodal sections, 5 mm in length, were excised from the second youngest internode of cv PG56, cv Nipponbare and *MT2b::Tos17*. Sections of cv PG56 were embedded in Technovit 7100, according to the manufacturer's instructions (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany), and cross-sections, 25 μm thick, were cut. The cv Nipponbare and *MT2b::Tos17* were embedded in LRwhite; cross-sections, 1 μm thick, were cut with a Leica RM 2255 microtome (Leica, Bensheim, Germany) and observed under bright-field illumination using an Olympus BX41 microscope (Olympus, Hamburg, Germany). For

transmission electron microscopy (TEM), 10-mm-long internodal sections from internodes of cv Nipponbare were fixed, dehydrated and embedded in LRwhite. Cross-sections, 60–80 nm thick, were cut with a Leica Ultracut UCT, prepared for TEM analysis and analyzed with a Philips 208 S transmission electron microscope.

Aerenchyma

Early- and late-stage aerenchyma were counted in cross-sections obtained at 10, 20, 30 or 40 mm above the second, third or fourth node as indicated. Aerenchyma formation was expressed as a percentage of the maximal number of aerenchyma that can be formed in the stem of a given genotype, as indicated in Table 1.

Staining methods and superoxide anion radical assay

For the staining of dead cells, 1-mm-long internodal sections were excised at the positions indicated, stained with 2% (w/v) Evans blue for 10 s and washed three times with water (Mergemann & Sauter, 2000). To visualize starch, internodal sections were stained with Lugol's solution (1 : 2 I/KI) for 60 s and washed three times with water. To detect superoxide anion radicals, 1 mM nitroblue tetrazolium (NBT; Sigma-Aldrich) was applied in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8 (Hückelhoven *et al.*, 2000). To detect H₂O₂, the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) Enhanced Liquid Substrate System was used according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). To detect O₂^{•-} and H₂O₂ *in situ*, 6-mm-long internodal cross-sections were vacuum infiltrated with either NBT or DAB solution for 15 min. NBT staining was visualized 90 min, and DAB staining was visualized 180 min, after vacuum infiltration. In all cases, staining was observed with a binocular (Olympus).

For the quantitative analysis of O₂^{•-}, 2-mm-thick tissue sections were excised 20 mm above the third node after the treatment of stem sections with 150 µM ethephon for the times indicated. Three slices each were weighed, and ground with a pestle in 500 µl of 50 mM Tris-HCl at pH 7.8. The extract was centrifuged for 10 min at 8000 g; 300 µl of the supernatant were transferred to 1 ml of

1 mM epinephrine and 1 mM KCN in 50 mM Tris-HCl. O₂^{•-} evolution was assayed spectrophotometrically (Sagi & Fluhr, 2001) by measuring the change in absorbance at 480 nm after 1 h, which occurs as a result of the oxidation of epinephrine to adrenochrome by O₂^{•-}.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Minitab (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, PA, USA). Percentages were transformed with arcsine√(x/100) to obtain normally distributed data. Comparison of means was analyzed for statistical significance with an analysis of variance (ANOVA) and Tukey test, or with a two-sample *t*-test. Constant variance and normal distribution of the data were verified before statistical analysis, and the *P* value was set to *P* < 0.001 if one of both conditions was not achieved. The *P* value for the Pearson product moment correlation is indicated in the figure and table legends.

Results

Parenchyma cells that form aerenchyma in the stem are morphologically distinct

In order to characterize the parenchymal cells that form aerenchyma in the rice stem, light micrographs were taken from cross-sections of the second youngest internode of deep-water rice cv PG56 (Fig. 1a–f). Morphological studies were carried out on cross-sections from untreated plants. Cells that formed aerenchyma appeared to be distinct from other parenchymal cells in that they were lighter than the green parenchymal cells that surrounded them (Fig. 1a). These lighter colored cells that have the potential to develop into aerenchyma were hence termed pre-aerenchymal cells. A cross-section displayed, on average, 28.5 pre-aerenchymal areas that were located in between the outer ring of vascular bundles (Fig. 1a–f, Table 1). Three to five parenchymal cells were present between the (pre-)aerenchyma and epidermis. The average number of (pre-)aerenchymal areas was 27.6 in cv Kinmaze and 28.6 in cv Nipponbare, and was thus a conserved feature in deep-water and lowland rice (Fig. 2a, Table 1). Staining with Lugol's solution revealed that pre-aerenchymal cells contained less starch than the surrounding parenchymal cells, which were stained dark (Fig. 1b). Cell death, as visualized with Evans blue staining, was observed not only in pre-aerenchymal cells, but also in the cell layers proximal to the lacunae and in vascular bundles (Fig. 1c). Analysis of cross-sections of cv Nipponbare by TEM revealed that pre-aerenchymal cells had a thinner cell wall and were larger than surrounding parenchymal cells (Fig. 2b,c). Furthermore, pre-aerenchymal cells had a large vacuole and little cytoplasm that appeared to be devoid of chloroplasts (Fig. 2b,c).

Table 1 Maximal number of aerenchyma that can develop in the stem of deep-water rice cv PG56 and lowland rice cultivars Kinmaze and Nipponbare [wild-type (wt) and *MT2b::Tos17* line]

Number of aerenchyma			
cv PG56	cv Kinmaze	cv Nipponbare	
Wild-type	Wild-type	Wild-type	<i>MT2b::Tos17</i>
28.5 (± 0.3)	27.6 (± 0.4)	28.6 (± 0.3)	27.8 (± 0.3)

Results are averages (± SE) from 14–37 stem sections analyzed. Numbers are not significantly different (*P* < 0.001; ANOVA, Tukey test).

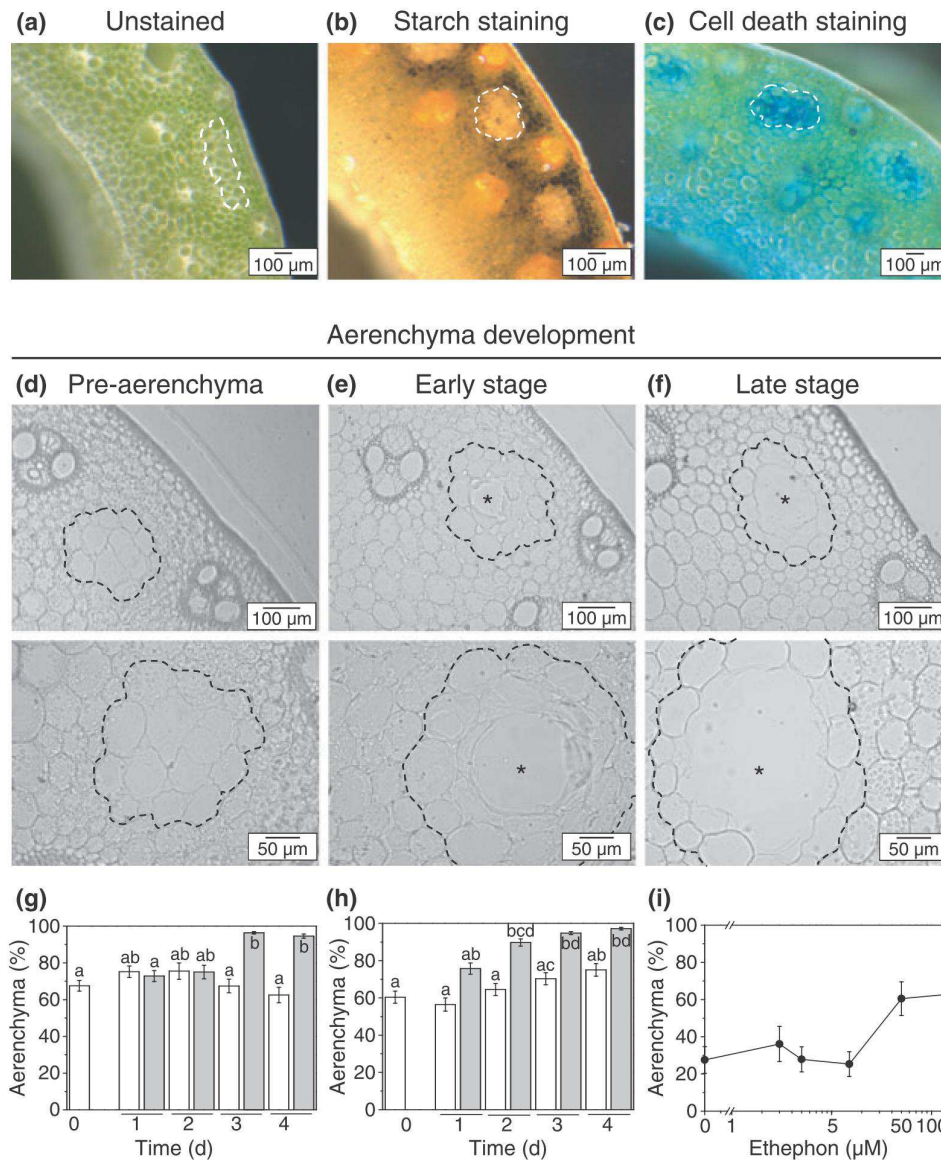


Fig. 1 Submergence and ethylene promote aerenchyma formation in internodes of rice. Cross-sections were cut 20 mm above the third node of deep-water rice cv PG56 plants. White or black dashed lines in (a–f) surround areas (pre-aerenchyma) that will develop into aerenchyma, and the cell layer that will not be lysed but has similar features to pre-aerenchymal cells. (a) Pre-aerenchymal cells are lighter in colour than the surrounding green parenchymal cells. (b) A cross-section was stained for starch with Lugol's solution. The dark staining indicates that starch accumulates mainly in parenchymal cells surrounding (pre-)aerenchyma. Cells that later on are lysed to form aerenchyma contain little starch. (c) A cross-section was stained with Evans blue to visualize dead cells. Staining is obvious in the vasculature in pre-aerenchymal cells and in the parenchymal cell layers proximal to the lacunae. (d–f) Three stages of aerenchyma formation were distinguished. (d) In pre-aerenchyma, all cells are still present. (e) In early-stage aerenchyma, one or a few cells have disappeared; the aerenchyma is indicated by an asterisk. (f) In late-stage aerenchyma, one layer of light-colored, chloroplast-free parenchymal cells occasionally persists. (g) Plants were partially submerged (gray bars) with the third node c. 60 cm beneath the water surface, or kept in air as a control (white bars). Aerenchyma are expressed as a percentage of the maximal number of aerenchyma that can be formed in the stem (see Table 1). The number of aerenchyma formed at 20 mm above the third node was enhanced significantly after 3 d of partial submergence ($P < 0.001$; ANOVA, Tukey test). Results are the means (\pm SE) from 27–54 stems analyzed per treatment in three biological experiments. (h) Stem sections containing the second internode were treated with 150 μ M ethephon (gray bars), an ethylene-releasing compound, or without effector as a control (white bars). Results are the means (\pm SE) from 40–48 stems analyzed per treatment in three biological experiments. Aerenchyma formation at 20 mm above the third node was enhanced significantly by ethephon after 2 d. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.001$; ANOVA, Tukey test). (i) Dose-dependent aerenchyma formation in response to ethephon. Stem sections were treated for 2 d and aerenchyma were analyzed at 10 mm above the third node. The asterisk indicates a statistically significant difference between the control and 150 μ M ethephon treatment ($P < 0.05$, two-sample *t*-test).

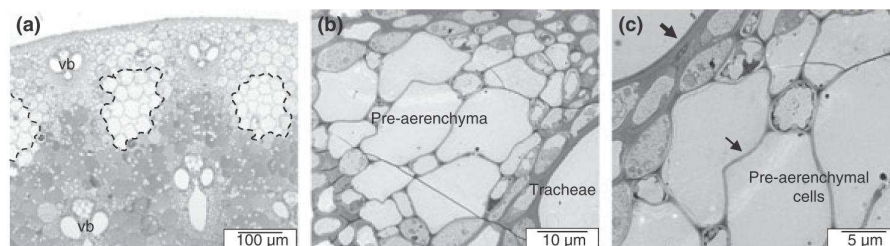


Fig. 2 Pre-aerenchymal cells are distinct from their surrounding parenchymal cells. (a) Light micrograph of a cross-section from the second youngest internode, 20 mm above the third node, of lowland rice cv Nipponbare plants. Pre-aerenchyma (surrounded by a dashed line) are located between vascular bundles (vb). (b, c) Transmission electron micrographs from the same region as described in (a). Pre-aerenchymal cells have thinner cell walls (thin arrow) than surrounding parenchymal cells (thick arrow), are highly vacuolated and have no chloroplasts.

Aerenchyma formation in the rice stem is enhanced by submergence and by ethylene

Aerenchyma form from seemingly intact cells (Fig. 1d, pre-aerenchyma) that may, however, already have lost their membrane integrity, resulting in Evans blue staining as observed in Fig. 1(c). Cell lysis begins at the center of the pre-aerenchymal area (early-stage aerenchyma) and expands radially, such that, later on, one layer of light-shaded, highly vacuolated cells remains that eventually also disappears (late-stage aerenchyma; Fig. 1e,f).

Deep-water rice plants of cv PG56 were partially submerged for up to 4 d and the percentage of aerenchyma was determined at a distance of 20 mm above the third node after 1, 2, 3 and 4 d (Fig. 1g). The percentage of aerenchyma formed was determined from the number of early- and late-stage aerenchyma in relation to the total number of (pre-)aerenchymal areas. As a control, plants were kept in air. Approximately 70% of constitutive aerenchyma formation was observed in control plants. On submergence, the percentage increased significantly within 3 d, reaching close to 100%. Subsequently, stem sections, including the second youngest internode, were excised and treated with or without 150 μ M ethephon for up to 4 d and aerenchyma formation was again analyzed 20 mm above the third node. The percentage of aerenchyma increased from 64.6% in controls to 89.7% after 2 d, and further increased to 94.8%

after 3 d and to nearly 100% after 4 d of ethephon treatment (Fig. 1h). Although, in untreated stems, the majority of aerenchyma were in the early stage (Table 2), ethylene treatment not only increased significantly the total number of aerenchyma, but also the percentage of late-stage aerenchyma ($P < 0.001$, ANOVA, Tukey test). The lowland rice cultivars Nipponbare (Fig. 5) and Kinmaze (Supporting Information Fig. S1) showed fewer constitutively formed aerenchyma when compared with the deep-water rice variety. However, the induction of aerenchyma formation was observed in all three genotypes.

A dose-dependent response to ethylene was studied in deep-water rice cv PG56 at 10 mm above the third node (Fig. 1i). Ethephon concentrations up to 15 μ M were ineffective in promoting aerenchyma formation within 2 d. Constitutively, *c.* 30% of aerenchyma were formed at this distance. In the presence of 50 or 150 μ M ethephon, aerenchyma formation was *c.* 60%, reminiscent of a threshold response. These results not only confirmed that aerenchyma were induced by ethylene in the rice stem, but revealed that fewer aerenchyma were constitutively present at 10 mm above the third node when compared with 20 mm above the third node.

To follow up on this observation, we next analyzed how many aerenchyma were present constitutively in the first, second and third internodes of cv PG56 plants. In addition, aerenchyma formation was determined after plants had

Table 2 Percentages of early- and late-stage aerenchyma formed after submergence or treatment with 150 μ M ethephon (+ 150 μ M E) in the second internode of deep-water rice cv PG56, as summarized in Fig. 1g,h

Days	Control		Submerged		Control		+ 150 μ M E	
	Early	Late	Early	Late	Early	Late	Early	Late
0	44.8	22.7			38.5	21.8		
1	42.8	32.3	47.1	25.8	34.3	22.1	35.8	39.9
2	34.5	41.1	47.2	27.8	35.3	29.3	24.7	65.1
3	37.5	30.0	26.7	69.6	35.1	35.2	25.1	69.8
4	36.8	25.7	21.6	73.0	32.2	42.8	5.4	91.8

After 2, 3 and 4 d of ethephon treatment, the percentages of late aerenchyma are significantly different ($P < 0.001$, ANOVA, Tukey test).

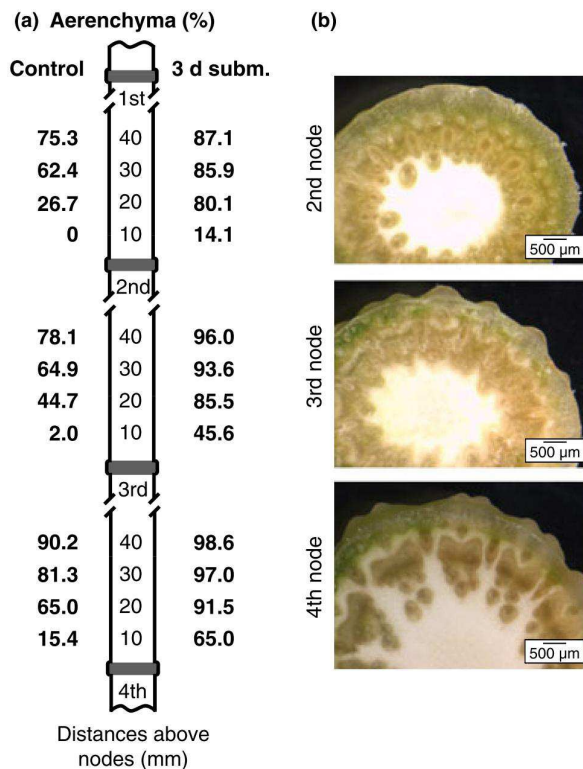


Fig. 3 Developmental regulation of aerenchyma formation. (a) Deep-water rice cv PG56 plants were partially submerged for 3 d (3 d subm.) with c. 30 cm of the leaf tips remaining above the water surface. The percentage of aerenchyma formed was determined at 10, 20, 30 and 40 mm above the second, third and fourth nodes. Each internode was characterized by few aerenchyma at the base and increasing numbers towards the top. On submergence, aerenchyma numbers increased along the length of each internode; however, a gradient from base to top persisted. Per treatment, 12–15 plants were analyzed in two independent experiments. (b) Cross-sections of the second, third and fourth nodes show a spongy tissue in the center and no gas spaces in the parenchyma, indicating that neither the central pith cavity nor the aerenchyma traverse the nodes.

been submerged for 3 d. Aerenchyma were counted 10, 20, 30 and 40 mm above each node (Fig. 3a). Unlike older internodes, the youngest internode possesses an intercalary meristem that extends 5 mm above the second node, from which cells are released into the elongation zone, which extends up to 15 mm above the node (Sauter & Kende, 1992). After 3 d of submergence, the elongation zone extends up to 35 mm above the node (Kende *et al.*, 1998). No aerenchyma were observed in the elongation zone of the youngest internode, 10 mm above the second node. Aerenchyma were observed within the differentiation zone of the youngest internode, reaching 75.3% at 40 mm above the node. The second internode showed slightly more aerenchyma, especially 20 mm above the third node. The third internode showed, overall, more constitutively formed aer-

enchyma, but a general pattern was observed in all internodes: few aerenchyma existed at the base of each internode; an abrupt increase in aerenchyma numbers occurred between 10 and 20 mm above each node; and a gradual increase was observed further up, reaching 90% in the oldest internode. No aerenchyma were present at the nodes (Fig. 3b). Partial submergence resulted in increased aerenchyma formation throughout each internode, indicating that all tissues were responsive to the cell death and cell lysis signal(s).

ROS accumulate in pre-aerenchymal cells and H_2O_2 promotes aerenchyma formation

To analyze the involvement of ROS in aerenchyma formation, we first determined whether the ROS species H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ were present in pre-aerenchymal cells. H_2O_2 was visualized with DAB and was detected as a brown precipitate in cross-sections 20 mm above the third node (Fig. 4b). H_2O_2 appeared to be particularly abundant in the vasculature and was also detected in pre-aerenchymal cells. $O_2^{\cdot-}$ was detected with NBT, resulting in a blue precipitate (Fig. 4c). $O_2^{\cdot-}$ was present in pre-aerenchymal cells and in the cell layer surrounding aerenchyma. Not all pre-aerenchyma cell areas showed elevated H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ levels. We subsequently studied the effect of exogenously applied H_2O_2 on aerenchyma formation. Stem sections were treated with H_2O_2 at concentrations between 0.01% (v/v) and 3% (v/v) for 3 d, and aerenchyma were counted 10 and 20 mm above the third node (Fig. 4d,e). Aerenchyma formation was promoted by H_2O_2 in a dose-dependent manner (Fig. 4d,e). At 10 mm, aerenchyma formation was enhanced significantly with 1% (v/v) H_2O_2 . At 20 mm, a significant increase was observed with 0.3% (v/v) H_2O_2 . At this distance, aerenchyma numbers are constitutively high at 75.9%, but were increased by H_2O_2 up to 96.8%. A time course experiment was carried out with the application of 3% (v/v) H_2O_2 for up to 3 d. The percentage of aerenchyma increased within 2 d at both 10 mm and 20 mm above the third node (Fig. 4d,e), revealing similar kinetics to those observed with ethephon.

To analyze whether ethylene promotes the formation of ROS, stem sections were incubated with or without 150 μ M ethephon for up to 24 h, and $O_2^{\cdot-}$ generation was measured using an assay with epinephrine as a substrate, which is oxidized to adrenochrome in the presence of $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 4f). $O_2^{\cdot-}$ generation in untreated stems remained nearly constant. Treatment with ethephon resulted in a significant increase in $O_2^{\cdot-}$ generation after 16 h. A similar result was obtained with the lowland rice cv Nipponbare, with a significant increase in $O_2^{\cdot-}$ generation after 16 h of ethephon treatment (data not shown). The peak in $O_2^{\cdot-}$ generation preceded aerenchyma formation induced by ethephon (Fig. 1h).

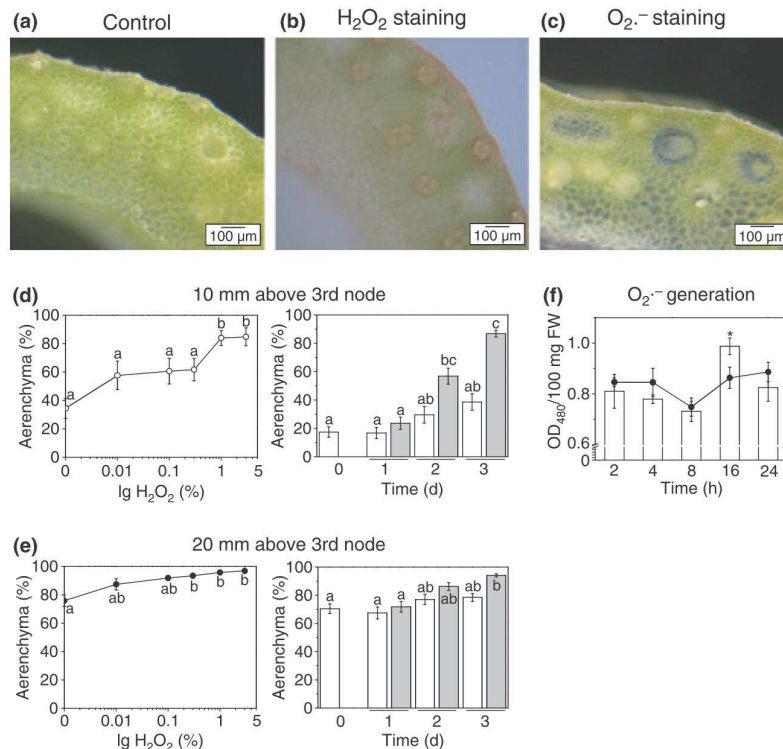


Fig. 4 Hydrogen peroxide (H_2O_2) promotes aerenchyma formation. Cross-sections were obtained from 20 mm above the third node of cv PG56 stem segments that were unstained (a), stained brown with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) to visualize H_2O_2 (b) or stained blue with nitroblue tetrazolium (NBT) to visualize $\text{O}_2^{\cdot-}$ (c). (d, e) Left-hand panels: stem sections were treated with H_2O_2 at concentrations between 0.01% and 3% (v/v) for 3 d. Aerenchyma formation was determined at 10 mm (d) and 20 mm (e) above the third node. Results are averages (\pm SE) from 13–16 stem sections analyzed per treatment in two experiments. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.001$; ANOVA, Tukey test). (d, e) Right-hand panels: stem sections were treated with 3% (v/v) H_2O_2 for up to 3 d (gray bars) and the percentages of aerenchyma were determined at 10 mm (d) and 20 mm (e) above the third node (control, white bars.) Results are averages (\pm SE) from 31–36 stems analyzed per treatment in three experiments. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.001$; ANOVA, Tukey test). (f) Stem sections were treated with or without 150 μM ethephon (E) for 2, 4, 8, 16 or 24 h, and the generation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ was determined at each time point in controls (circles) and treated (bars) samples. Results are means (\pm SE) from 12–16 measurements. The asterisk at 16 h indicates a statistically significant difference between control and ethephon treatment ($P < 0.05$, two-sample t -test).

Downregulation of *MT2b* enhances aerenchyma formation by submergence

Downregulation of the ROS scavenger gene *MT2b* has been shown previously to promote the death of epidermal cells above adventitious roots (Steffens & Sauter, 2009). To analyze whether *MT2b* was involved in aerenchymal cell death, aerenchyma formation was determined in the homozygous *MT2b::Tos17* insertion line. The *MT2b::Tos17* mutant was generated in the Nipponbare background; hence, wild-type (wt) cv Nipponbare was analyzed as a control. wt and *MT2b::Tos17* plants were partially submerged for up to 3 d and the percentages of aerenchyma formed were determined 20 mm above the third node (Fig. 5). The average numbers of aerenchyma per cross-section did not differ between wt cv Nipponbare and *MT2b::Tos17* (Table 1). Approximately 20% of aerenchyma developed constitutively in both lines, with wt having seemingly fewer constitutive aerenchyma than

MT2b::Tos17 (Fig. 5). In wt, the percentage increased to 39.5% after 2 d of submergence and to 48.5% after 3 d of submergence, indicating that aerenchyma formation in cv Nipponbare was induced by submergence with a lag phase longer than 1 d. In *MT2b::Tos17*, 55.7% aerenchyma developed after 2 d and 66.9% after 3 d of submergence. After 3 d, the differences between wt and mutant were statistically significant (two-sample t -test, $P < 0.001$).

Discussion

Improved gas exchange is considered to be a hallmark of flooding tolerance, and is observed in essentially all wetland species. Improved gas exchange is achieved externally through leaf gas films that transport oxygen from leaves which remain above the water surface to submerged plant parts (Raskin & Kende, 1985), or that enlarge the gas–water interface in completely submerged plants (Pedersen

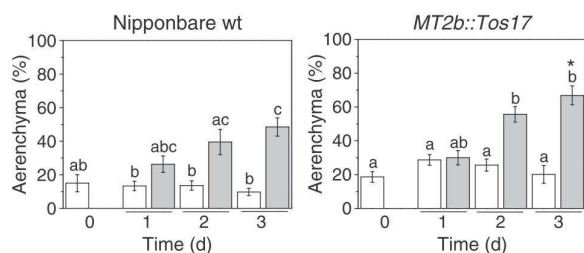


Fig. 5 Downregulated *MT2b* expression promotes aerenchyma formation during submergence. *MT2b::Tos17* and wild-type (wt) plants of the lowland rice cv Nipponbare were partially submerged (gray bars) or kept in air as a control (white bars). Aerenchyma formation was enhanced significantly in both lines after 2 d of submergence at a distance of 20 mm above the third node ($P < 0.001$, ANOVA, Tukey test). Different letters indicate statistically significant differences. After 3 d of submergence, significantly more aerenchyma had formed in *MT2b::Tos17* relative to wt, as indicated by an asterisk (two-sample *t*-test, $P < 0.001$). Results are means (\pm SE) from 17–58 stems analyzed per genotype and treatment in two experiments.

et al., 2009). Improved gas exchange is further achieved through internal air spaces. As soil waterlogging or flooding affects primarily the roots, much research has focused on the study of aerenchyma formation in roots (e.g. Raskin & Kende, 1983; Webb & Armstrong, 1983; Schussler & Longstreth, 1996; Colmer, 2003). However, aerenchyma formation also occurs in stems and other shoot organs, where it may be especially important during deep floods when shoots become partially submerged, such as in rice (Arashi & Nitta, 1955). In this study, developmental and submergence-induced aerenchyma formation was analyzed in the rice stem. The deep-water rice variety PG56 showed a higher percentage of aerenchyma formed constitutively than the lowland rice varieties Kinmaze and Nipponbare, with the total number of aerenchymal tracts being the same in the two varieties. In the rice stem, aerenchyma were formed in between the vascular bundles which were located in an outer ring below the epidermis. The conserved number of aerenchyma may be a result of the conserved anatomy of rice with a defined number of vascular bundles in the stem.

The number of aerenchyma formed increased from bottom to top in a recurrent pattern that was observed in each internode. Nodes did not display gas spaces. Aerenchyma are constitutively formed in many aquatic or semi-aquatic plant species. On flooding, enhanced aerenchyma formation is observed in (semi-)aquatic, but also in nonaquatic species, as shown for maize (Drew *et al.*, 1989; He *et al.*, 1994), *Spartina patens* (Burdick, 1989), *Luffa cylindrica* (Shimamura *et al.*, 2007) and *Rumex palustris* (Laan *et al.*, 1991; Pierik *et al.*, 2009), to name only a few. However, not all plants can form aerenchyma, as reported for *Brassica napus* (Voeselek *et al.*, 1999). Consequently, the porosity value in aerated rapeseed roots is 3%, whereas rice roots show a constitutive porosity of 25–30% (Armstrong,

1971). During submergence, the porosity value remains constant in rapeseed and increases to 40–50% in rice roots. In the rice stem, partial submergence for 3 d resulted in an increase in aerenchyma formation throughout all internodes, indicating that all pre-aerenchymal cells were responsive to the cell death and cell lysis promoting signal. Despite the overall increase in aerenchyma numbers following submergence, a gradient remained in each internode, with fewer aerenchyma at the base than at the top. For instance, twice as many aerenchyma were counted at distances of 30 and 40 mm than at 10 mm above the third node. This gradient within the stem is exacerbated by the fact that nodes do not form any aerenchyma, indicating that neither aerenchyma nor the central pith cavity form a continuous gas space even when submerged. It is, however, conceivable that gas flow across the node occurs through intercellular spaces. Gas flow measurements, such as were performed in *Phragmites australis* (Afreen *et al.*, 2007), will be required to determine the actual resistance to gas diffusion in the internodes and at the stem nodes of rice. It has been proposed that aerenchyma not only improve gas exchange, but also reduce the number of cells requiring oxygen for respiration (Kawai *et al.*, 1998). In maize roots, aerenchyma form even under drought conditions (Zhu *et al.*, 2010). Recombinant inbred maize lines with high root cortical aerenchyma produced higher shoot biomass and more seed when grown under water-stressed (drought) conditions than did lines which formed very few aerenchyma. The improved drought tolerance in lines with high aerenchyma formation has been proposed to be a result of reduced metabolic cost in the roots caused by reduced cell numbers (Zhu *et al.*, 2010).

A more detailed analysis of the cells that are lysed to form a gas space in the rice stem revealed that these cells possess characteristic features. They are larger, as also observed for cortex cells in rice roots that form aerenchyma (Kawai *et al.*, 1998). They contain a large vacuole, are lighter in color and appear to be devoid of chloroplasts. Unlike the surrounding parenchymal cells, pre-aerenchymal cells contain little or no starch, and have a thin cell wall. By contrast, the walls in cells that surround aerenchyma are thicker, an observation that was also made in other (semi-)aquatic species, such as *Astrocaryum jauari* (Schlüter *et al.*, 1993). Thick cell walls around an aerenchyma are thought to prevent its collapse, as the hydrostatic pressure increases with water depth. In rice internodes, pre-aerenchymal cells were occasionally stained with Evans blue, indicating that they had undergone cell death, but were not yet lysed. Overall, cells that eventually form gas spaces in the rice stem do not appear to participate greatly in photosynthetic activity, or contribute to tissue stability, raising the question of why they are maintained to begin with.

Aerenchyma formation in response to submergence has been shown previously to be regulated by ethylene in wheat

(Watkin *et al.*, 1998) and maize (Drew *et al.*, 1981; Konings, 1982; Jackson *et al.*, 1985; He *et al.*, 1996; Gunawardena *et al.*, 2001) roots. In rice, ethylene can promote aerenchyma formation in adventitious roots (Justin & Armstrong, 1991), and in internodes, as shown in this study. To date, little else is known about cell death regulation and lysis of cells during gas space formation. ROS have been recognized as central components of cell death signaling (Kotchoni & Gachomo, 2006). Cadmium-induced death of suspension cells of tomato was enhanced by ethylene and was accompanied by elevated levels of H₂O₂ (Yakimova *et al.*, 2006). In rice, death of epidermal cells above nodal adventitious root primordia was induced by ethylene and H₂O₂ (Steffens & Sauter, 2009). Pre-aerenchymal cells in the rice internode were characterized by elevated levels of superoxide anion radical and H₂O₂ when compared with surrounding cells. Induction of aerenchyma formation by ethylene was preceded by an increase in O₂^{•-}, reminiscent of an oxidative burst, at *c.* 16 h that preceded ethylene-induced aerenchyma formation. In the mid-cortex of maize roots, aerenchyma formation induced by sulfate starvation was similarly preceded by O₂^{•-} and H₂O₂ generation that was observed in some of these cells (Bouranis *et al.*, 2003). Epidermal cell death in rice was also promoted when endogenous levels of H₂O₂ were increased by the inhibition of catalase activity. Similarly, exogenous application of H₂O₂ promoted epidermal cell death, even in the presence of 1-methylcyclopropene, which inhibits ethylene perception, indicating that H₂O₂ acts downstream of ethylene.

Steady-state levels of ROS result from a balance between synthesis and scavenging. ROS detoxification is achieved enzymatically, for example by ascorbate peroxidase, superoxide dismutase or catalase, or nonenzymatically (Jwa *et al.*, 2006). In rice, the metallothionein MT2b acts as a scavenger of H₂O₂ (Wong *et al.*, 2004). Genetic downregulation of *MT2b* in rice promoted epidermal cell death and hypersensitive cell death in leaves (Wong *et al.*, 2004; Steffens & Sauter, 2009), and enhanced submergence-induced aerenchyma formation in the stem. These findings support the view that altered ROS scavenging is a highly efficient means to alter ROS levels, such that a physiological cell death response follows. In epidermal cells above adventitious root primordia, *MT2b* was shown to be downregulated in response to ethylene or H₂O₂, indicating that reduced ROS scavenging through altered MT2b activity may be a general mechanism of cell death regulation in rice.

Acknowledgements

We thank Akio Miyao (Genome Research Centre, Ibaraki, Japan) for kindly supplying the *MT2b::Tos17* insertion line NE7013. Support of this work by the Deutsche Forschungsgemeinschaft is gratefully acknowledged.

References

- Afreen F, Zobayed SMA, Armstrong J, Armstrong W. 2007. Pressure gradients along whole culms and leaf sheaths, and other aspects of humidity-induced gas transport in *Phragmites australis*. *Journal of Experimental Botany* 58: 1651–1662.
- Arashi K, Nitta H. 1955. Studies on the lysigenous intercellular space as the ventilating system in the culm of rice and some other graminaceous plants. *Proceedings of the Crop Science Society of Japan* 24: 78–81.
- Armstrong W. 1971. Radial oxygen losses from intact rice roots as affected by distance from the apex, respiration and waterlogging. *Physiologia Plantarum* 25: 192–197.
- Bouranis DL, Chorianoopoulou SN, Siyiannis VF, Protonotarios VE, Hawkesford MJ. 2003. Aerenchyma formation in roots of maize during sulphate starvation. *Planta* 217: 382–391.
- Burdick DM. 1989. Root aerenchyma development in *Spartina patens* in response to flooding. *American Journal of Botany* 76: 777–780.
- Colmer TD. 2003. Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* 91: 301–309.
- Colmer TD, Pedersen O. 2008. Oxygen dynamics in submerged rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* 178: 326–334.
- Drew MC, He CJ, Morgan PW. 1989. Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen- or phosphate-starvation in adventitious roots of *Zea mays* L. *Plant Physiology* 91: 266–271.
- Drew MC, Jackson MB, Giffard SC, Campbell R. 1981. Inhibition by silver ions of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to exogenous ethylene or to oxygen deficiency. *Planta* 153: 217–224.
- Evans DE. 2003. Aerenchyma formation. *New Phytologist* 161: 35–49.
- Fukao T, Xu K, Ronald PC, Bailey-Serres J. 2006. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell* 18: 2021–2034.
- Gunawardena AH, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE. 2001. Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 212: 205–214.
- Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song X-J, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H *et al.* 2009. The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460: 1026–1030.
- He CJ, Drew MC, Morgan PW. 1994. Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* during hypoxia or nitrogen starvation. *Plant Physiology* 105: 861–865.
- He CJ, Morgan PW, Drew MC. 1996. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiology* 112: 463–472.
- Hückelhoven R, Fodor J, Trujillo M, Kogel KH. 2000. Barley Mla and Rar mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates at sites of fungal invasion. *Planta* 212: 16–24.
- Jackson MB, Fenning TM, Drew MC, Saker LR. 1985. Stimulation of ethylene production and gas-space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. by small partial pressures of oxygen. *Planta* 165: 486–492.
- Justin SHFW, Armstrong W. 1991. Evidence for the involvement of ethylene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* 118: 49–62.
- Jwa NS, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, Rakwal R. 2006. Role of defense/stress-related marker genes, proteins

- and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 261–273.
- Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H. 1998. Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* 204: 277–287.
- Kende H, van der Knaap E, Cho HAT. 1998. Deepwater rice: a model plant to study stem elongation. *Plant Physiology* 118: 1105–1110.
- Konings H. 1982. Ethylene-promoted formation of aerenchyma in seedling roots of *Zea mays* L. under aerated and non-aerated conditions. *Physiologia Plantarum* 54: 119–124.
- Kotchoni SO, Gachomo EW. 2006. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of Biosciences* 31: 389–404.
- Laan P, Clement JMAM, Blom CWPM. 1991. Growth and development of *Rumex* roots as affected by hypoxic and anoxic conditions. *Plant and Soil* 136: 145–151.
- Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology* 48: 251–275.
- Matsukura C, Kawai M, Toyofuku K, Barrero RA, Uchimiya H, Yamaguchi J. 2000. Transverse vein differentiation associated with gas space formation – fate of the middle cell layer in leaf sheath development of rice. *Annals of Botany* 85: 19–27.
- Mergemann H, Sauter M. 2000. Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiology* 124: 609–614.
- Mühlenbock P, Plaszczycza M, Plaszczycza M, Mellerowicz E, Karpinski S. 2007. Lysigenous aerenchyma formation in *Arabidopsis* is controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *Plant Cell* 19: 3819–3830.
- Pedersen O, Rich SM, Colmer TD. 2009. Surviving floods: leaf gas films improve O₂ and CO₂ exchange, root aeration, and growth of completely submerged rice. *Plant Journal* 58: 147–156.
- Pierik R, van Aken JM, Voesenek LA. 2009. Is elongation-induced leaf emergence beneficial for submerged *Rumex* species? *Annals of Botany* 103: 353–357.
- Raskin I, Kende H. 1983. How does deep water rice solve its aeration problem. *Plant Physiology* 72: 447–454.
- Raskin I, Kende H. 1985. Mechanism of aeration in rice. *Science* 228: 327–329.
- Sagi M, Fluhr R. 2001. Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* 126: 1281–1290.
- Sauter M. 1997. Differential expression of a CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and cdc2 genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *Plant Journal* 11: 181–190.
- Sauter M, Kende H. 1992. Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Planta* 188: 362–368.
- Schlüter UB, Furch B, Joly CA. 1993. Physiological and anatomical adaptations by young *Astrocaryum jauari* Mart. (Arecaceae) in periodically inundated biotopes of Central Amazonia. *Biotropica* 25: 384–396.
- Schussler EE, Longstreth DJ. 1996. Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). *American Journal of Botany* 83: 1266–1273.
- Shimamura S, Yoshida S, Mochizuki T. 2007. Cortical aerenchyma formation in hypocotyl and adventitious roots of *Luffa cylindrica* subjected to soil flooding. *Annals of Botany* 100: 1431–1439.
- Shiono K, Takahashi H, Colmer TD, Nakazono M. 2008. Role of ethylene in acclimations to promote oxygen transport in roots of plants in waterlogged soils. *Plant Science* 175: 52–58.
- Steffens B, Sauter M. 2005. Epidermal cell death in rice (*Oryza sativa* L.) is regulated by ethylene, gibberellin and abscisic acid. *Plant Physiology* 139: 713–721.
- Steffens B, Sauter M. 2009. Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H₂O₂ through an autoamplified signal pathway. *Plant Cell* 21: 184–196.
- Visser EJW, Bögemann GM. 2006. Aerenchyma formation in the wetland plant *Juncus effusus* is independent of ethylene. *New Phytologist* 171: 305–314.
- Voesenek LACJ, Armstrong W, Bögemann GM, McDonald MP, Colmer TD. 1999. A lack of aerenchyma and high rates of radial oxygen loss from the root base contribute to the waterlogging intolerance of *Brassica napus*. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 87–93.
- Watkin ELJ, Thomson CJ, Greenway H. 1998. Root development and aerenchyma formation in two wheat cultivars and one triticale cultivar grown in stagnant agar and aerated nutrient solution. *Annals of Botany* 81: 349–354.
- Webb T, Armstrong W. 1983. The effects of anoxia and carbohydrates on the growth and viability of rice, pea and pumpkin roots. *Journal of Experimental Botany* 34: 579–603.
- Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K. 2004. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiology* 135: 1447–1456.
- Yakimova ET, Kapchina-Toteva VM, Laarhoven LJ, Harren FM, Woltering EJ. 2006. Involvement of ethylene and lipid signalling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 581–589.
- Yuan J, Chen D, Ren Y, Zhang X, Zhao J. 2008. Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, OsMT2b, down-regulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice. *Plant Physiology* 146: 1637–1650.
- Zhu J, Brown KM, Lynch JP. 2010. Root cortical aerenchyma improve the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant, Cell & Environment* 33: 740–749.
- Zurbriggen MD, Carrillo N, Hajirezaei MR. 2010. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signaling & Behaviour* 5: 393–396.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 Submergence and ethylene promote aerenchyma formation in internodes of lowland rice cv Kinmaze.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

Kapitel 2

Weitere funktionelle und pharmakologische Charakterisierung der Aerenchymbildung und zytologische Untersuchungen des Zelltods

In Reisinternodien wird die Aerenchymbildung durch Überflutung und damit einer Akkumulation von Ethylen erhöht. Die Aerenchyme sind am Knoten durch ein poröses Diaphragma mit der Lakune und den Blattaerenchymen verbunden. Dadurch wird eine verbesserte Sauerstoffdiffusion innerhalb der Pflanze realisiert, aber auch eine Reduktion von ATP-konsumierenden Zellen erreicht. Neben Überflutung induziert Trockenstress die Aerenchymbildung in Internodien. Als weitere Signalkomponenten des programmierten Zelltods konnten Abscisinsäure, Auxin, Superoxidanion-Radikal ($O_2^{\bullet-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) identifiziert werden, wobei die beiden reaktiven Sauerstoffspezies eine antagonistische Rolle einnehmen. H_2O_2 induziert die Aerenchymbildung und ist dem Ethylen nachgeschaltet. $O_2^{\bullet-}$ inhibiert den Zelltodprozess.

In der Zelldifferenzierung der Präaerenchymzellen können heterotrimere G-Proteine eine Rolle spielen. Ein Defekt in der $G\alpha$ -Untereinheit führt zu einem Fehlen charakteristischer Interzellularen im Präaerenchym. Während des Zelltodprozesses der Präaerenchymzellen degradiert die nukleosomale DNA. Die Mitochondrien aggregieren und weisen mit vergrößerten Cristae und kondensierter Matrix eine veränderte Ultrastruktur auf. Diese Anzeichen deuten auf einen bevorstehenden Abbau der Organellen hin.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Anzucht

In dieser Arbeit wurden Wildtyppflanzen (WT-Pflanzen) des Tiefwasserreiskultivars Pin Gaew 56 (*Oryza sativa* L., ssp. *indica*, PG56) und des Flachlandreiskultivars Nipponbare (*Oryza sativa* L., ssp. *japonica*) verwendet. Des Weiteren wurden Experimente mit der *Knockdown*-Mutante *OsMT2b::Tos17* (Nipponbare) durchgeführt, die von Akio Miyao (Genome Research Center, Ibaraki, Japan) zur Verfügung gestellt wurde. Das Saatgut der *Knockdown*-Mutante *dwarf1 (d1)*, (Nipponbare) wurde von Motoyuki Ashikari (Nagoya University, Japan) bereitgestellt.

Samen keimten im Dunkeln für drei Tage auf feuchtem Filterpapier bei 27°C für 16 Stunden und bei 19°C für acht Stunden. Anschließend wurden die Keimlinge auf einem 2:1 Pikiererde/Lava-Basalt-Gemisch bei einer relativen Luftfeuchte von 70%, für 16 Stunden Licht bei 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Photonen und 27°C und acht Stunden Dunkelheit bei 19°C angezogen. Die Pflanzen wurden in den ersten zwei Wochen mit destilliertem Wasser und danach mit 0,2% (w/v) COMPO N4-P2-K5 chloridarmen Dünger (COMPO, Münster, Deutschland) versorgt. Experimente wurden mit elf bis 14 Wochen alten Pflanzen des Kultivars PG56 oder mit 18 bis 20 Wochen alten Reispflanzen des Kultivars Nipponbare durchgeführt.

Für die Arbeiten mit 20 cm langen Stängelsegmenten wurde 2 cm unterhalb und 18 cm oberhalb des dritten Knotens geschnitten. Stängelsegmente wurden, wenn nicht anders angegeben, vom zweitjüngsten Internodium hergestellt. Bis zu 15 Stängelsegmente wurden in ein 150 ml-Becherglas gegeben, welches, wenn nicht anders beschrieben, 20 ml einer wässrigen Lösung enthielt. Um eine hohe Luftfeuchte während des Versuches zu gewährleisten, wurden die Bechergläser in transparente Plexiglas-Zylinder gestellt. Die Inkubation erfolgte unter denselben Tag-Nacht-Bedingungen wie die Anzucht der Pflanzen.

Bei der Injektion von wässrigen Lösungen in die Lakune wurden Stängelsegmente verwendet, die zusätzlich den zweiten Knoten

enthielten. Es wurde mit einer Einmal-Injektions-Kanüle mit einem Durchmesser von 0,40 mm und einer Länge von 20 mm (Braun, Melsungen, Deutschland) ein Loch 5 mm unterhalb des zweiten Knotens bis in die Lakune gestochen. Anschließend wurde ein zweites Loch circa 1,5 cm oberhalb des dritten Knotens gestochen und über dieses mit einer 5 ml-Einmalspritze (Braun, Melsungen, Deutschland) die Lösung injiziert. Das Internodium wurde vollständig mit Lösung gefüllt und die Löcher mit Lanolin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verschlossen.

Auszählung und Berechnung der Aerenchyme in Internodien

Zur Bestimmung der Aerenchymanzahl in Internodien wurden Stängelquerschnitte angefertigt (siehe Kapitel 1). Präaerenchymfelder und Aerenchyme wurden unter einem Binokular (Olympus, Hamburg, Deutschland) gezählt. Die Aerenchyme in Prozent ergaben sich aus der Anzahl der Aerenchyme im Verhältnis zur maximalen Anzahl an möglichen Aerenchymen im Stängelquerschnitt.

Untersuchungen zur Aerenchymbildung in Internodien

Die Untersuchungen erfolgten mit Stängelsegmenten des zweitjüngsten Internodiums des Kultivars PG56. Es wurden verschiedene Lösungen in die Lakune injiziert oder über den Transpirationsstrom aufnehmen gelassen. Die Konzentrationen der verwendeten Effektoren und Inhibitoren und die Art der Zugabe erfolgte wie in Tabelle 2 angegeben. Kontrollen wurden mit destilliertem Wasser inkubiert. Verwendete Konzentrationen, die Kombinationen und die Inkubationszeiten können den Abbildungen im Ergebnisteil entnommen werden.

Tabelle 2: Verwendete Effektoren und Inhibitoren für Experimente an Stängelsegmenten.

Effektor/Inhibitor	Trivialname/Abkürzung	Konzentration	Applikation
2-Chlorethylphosphonsäure	Ethephon	50 µM/150 µM	Transpirationsstrom
		150 µM	Lakune
Nordihydroguaiaretische Säure	NDGA	100 µM	Transpirationsstrom
Gibberellinsäure	GA	30 µM	Transpirationsstrom
Abscisinsäure	ABA	10 µM	Transpirationsstrom
1-N-Naphthylphtalaminsäure	NPA	10 µM	Transpirationsstrom
1-Methylcyclopropen	1-MCP	5 ppm	gesamtes Segment
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	3% (v/v)	Transpirationsstrom
3-Amino-1,2,4-triazol	AT	200 mM	Lakune
Diethyldithiocarbamat	DDC	100 mM	Lakune

Eine Vorinkubation erfolgte mit NPA für drei Stunden, mit 1-MCP für drei bzw. sechs Stunden und mit DDC für sechs Stunden. Bei Verwendung von H₂O₂ wurden die Segmente nach Vorinkubation unterhalb des dritten Knotens auf 0,5 cm gekürzt und mit jeweils 50 ml der entsprechenden Lösung inkubiert. Ethephon, AT und DDC wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), GA, ABA und NPA von Duchefa (Haarlem, Niederlande), 1-MCP von AgroFresh (Niederlande) und H₂O₂ von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Nach der Inkubation wurden die Aerenchyme 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt.

Für die Untersuchung des Einflusses von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf die Aerenchymbildung wurden die Aerenchyme von Wildtyp-Pflanzen des Kultivars Nipponbare und der Linie *OsMT2b::Tos17* in den ersten drei Internodien jeweils 1, 2, 3 und 4 cm über den basalen Knoten bestimmt.

Für die Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die Aerenchymbildung wurden Stängelsegmente des Kultivars PG56 vom zweitjüngsten Internodium in gasdichten Plexiglas-Zylindern für drei Tage mit 21% O₂ oder einem Gasgemisch von 5% O₂ und 95% N₂ (Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland) inkubiert. Es erfolgte alle vier Stunden ein Austausch der Atmosphäre in den Zylindern. Die Aerenchymanzahl wurde

1 cm über dem dritten Knoten bestimmt und die Aerenchyme in Prozent berechnet.

Zur Untersuchung des Einflusses von Trockenstress auf die Aerenchymbildung wurden elf bis 14 Wochen alte Pflanzen des Tiefwasserreis-Kultivars PG56 für sieben Tage nicht gedüngt. Die Kontrollen wurden weiterhin mit Düngerlösung versorgt. Die Anzahl der Aerenchyme wurde 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt. In einem weiteren Versuch wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums des Kultivars PG56 einen Tag mit 100 μ M NDGA beziehungsweise mit destilliertem Wasser vorbehandelt und dann für drei Tage ohne Flüssigkeit oder in 20 ml destilliertem Wasser inkubiert. Die Aerenchyme in Prozent wurden 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt.

Um die Rolle der $G\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine in der Aerenchymbildung zu untersuchen, wurden *d1*- und Wildtyp-Pflanzen des Kultivars Nipponbare für sieben Tage partiell geflutet und die Aerenchyme sowie die maximal mögliche Anzahl an Aerenchymen in den ersten beiden Internodien 3, 10 und 20 mm über dem jeweiligen unteren Knoten gezählt. Es wurden die Aerenchyme in Prozent berechnet und die Anzahl an angelegten Präaerenchymfeldern bestimmt. Zusätzlich wurden 80 μ m dicke Querschnitte mit einem Vibratom (Leica, Bensheim, Deutschland) von unbehandelten Kontrollpflanzen 2 cm über dem zweiten Knoten hergestellt und die Präaerenchymfelder unter einem Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert und dokumentiert.

Histologischer Nachweis toter Zellen im Präaerenchym

Für die Untersuchung der toten Zellen im Präaerenchym wurde eine Evans Blau-Färbung durchgeführt. Es wurden 1 mm dicke Querschnitte von Internodien im zu analysierenden Bereich geschnitten und für 10 Sekunden in 2% (w/v) Evans Blau (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) inkubiert. Evans Blau färbt Zellen ohne intakte Plasmamembran blau (Gaff und Okong'O-Ogola, 1971). Nach

dreimaligem Waschen mit Leitungswasser wurden die Schnitte unter dem Binokular analysiert.

Sauerstoffmessungen in der Lakune und Analyse von hypoxie-induzierten Anpassungen

Es wurden Pflanzen des Kultivars PG56 für drei Tage in einem 600 l-Plastiktank entweder partiell (20 bis 30 cm der Pflanze oberhalb der Wasseroberfläche) oder komplett (gesamte Pflanze im Wasser) geflutet. Des Weiteren wurde partiell gefluteten Pflanzen entweder das dritte oder das vierte Blatt unterhalb der Wasseroberfläche fixiert. Es wurden nicht geflutete Pflanzen als Kontrollpflanzen genutzt. Die Tag-Nacht-Bedingungen entsprachen denen bei der Anzucht der Pflanzen. Die Probennahme erfolgte für die folgenden Experimente am Ende der Dunkelphase des dritten Tages.

Sauerstoff- und Ethylenmessung

Für die gaschromatische Bestimmung der Sauerstoff- und Ethylengehalte wurde aus Lakunen der jüngsten drei Internodien 600 µl Gas mit einer gasdichten 1 ml-Hamilton-Spritze (Eydam, Kronshagen, Deutschland) entnommen. 500 µl des Gasgemisches wurden über einen Gaschromatographen (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) aufgetrennt. Für die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration wurde ein Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) und für die Ermittlung der Ethylenkonzentration ein Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet. Die für die Detektion verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Spezifikationen des Gaschromatographen.

Bezeichnung	Shimadzu GC-14B
Integrator	Shimadzu Chromatopac C-R8A
Säule 1	2,5 m x 1/8"; Molekularsieb: 6A; 60/80
Säule 2	1,5 m x 1/8"; HayeSep Q; 80/100
Gase/Druck	He/150 kPa H ₂ /65 kPa synthetische Luft/50 kPa
Temperaturen	Säule: 80°C Injektor: 100°C Detektor: 100°C
Stromstärke TCD	50 mA

Adventivwurzelwachstum

Es wurde am zweiten, dritten und vierten Knoten der gefluteten Pflanzen und der Kontrollpflanzen die Anzahl der durchgebrochenen Adventivwurzeln und die Anzahl aller Wurzelanlagen bestimmt. Der Durchbruch in Prozent ergab sich aus dem Verhältnis der durchgebrochenen Adventivwurzeln zu der Anzahl aller angelegten Wurzeln (Lorbiecke und Sauter, 1999).

Aktivitätsmessung der Alkoholdehydrogenase (ADH)

Für die Bestimmung der ADH-Aktivität wurden 5 mm-Segmente aus den ersten drei Internodien auf Höhe von 1 bzw. 2 cm oberhalb des basalen Knotens isoliert. Der Schnitt erfolgte jeweils 2 mm ober- und unterhalb der angegebenen Höhe. Zusätzlich wurden der zweite, dritte und vierte Knoten und 3 cm lange Segmente des dritten Blattes genutzt. Bei partiell gefluteten Pflanzen wurden die Blattsegmente aus gefluteten oder aus dem Wasser herausragenden Bereichen isoliert.

Jeweils drei Internodien-, Knoten- oder Blattsegmente wurden vereint, in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Material mit 200 bis 500 µl Extraktionspuffer aus 0,1 M Tris-HCl (pH 8.0), 25% (v/v) Glycerol, 0,8% (v/v) β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) PVP und 5 mM DTT versetzt. Die Probe wurde für fünf Minuten bei 1400 rpm und 25°C auf dem

Thermoschüttler gemischt und anschließend 15 Minuten bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Proteingehalt wurde im Überstand über die Bradford-Methode (Roti-Quant, Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt. Für die Messung der ADH-Aktivität wurde 50 µg Protein aus Internodien und Knoten bzw. 100 µg Protein aus Blättern in 50 µl Extraktionspuffer verwendet. Zu dem Proteinextrakt wurden 800 µl Reaktionspuffer aus 62,5 mM Tris-HCl (pH 8.5) und 1 mM NAD, und 100 µl destilliertes Wasser gegeben und die Absorption bei 340 nm drei Minuten lang alle zehn Sekunden gemessen. Wenn nach drei Minuten keine Absorptionszunahme zu verzeichnen war, wurden 50 µl absoluter Ethanol hinzugegeben und die Absorption weitere drei Minuten gemessen. Die Enzymaktivität wurde, wie in Abbildung 1 dargestellt, berechnet.

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta A_{340 \text{ nm}} \cdot V_{\text{Küvette}}}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot V_{\text{Probe}} \cdot t}$$

Abbildung 1: Formel zur Berechnung der ADH-Aktivität. Hierbei entspricht $\Delta A_{340\text{nm}}$ der Absorptionsänderung gemessen bei 340 nm, $V_{\text{Küvette}}$ dem Küvettenvolumen, ϵ_{NADH} dem molekularen Extinktionskoeffizienten von $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ des NADH (Nakahara *et al.*, 1993), d der Schichtdicke der Küvette, V_{Probe} dem Probenvolumen und t der Zeit.

Porositätsmessungen

Die Porositätsmessung erfolgte entweder nach der auftriebsbasierten Methode oder über die Querschnittsanalyse (Visser und Bögemann, 2003). Bei der auftriebsbasierten Methode wurden Stängelsegmente des jüngsten und zweitjüngsten Internodiums des Kultivars PG56 für zwei Tage mit 150 µM Ethephon behandelt und danach 5 mm-Segmente 1, 2, 3, und 4 cm über dem dritten Knoten isoliert. Hierfür wurden die Stängel 2,5 mm ober- und unterhalb der angegebenen Höhe geschnitten. Zusätzlich wurde der zweite oder dritte Knoten isoliert. Zudem wurden

Pflanzen partiell geflutet und die ersten vier Knoten isoliert. Es wurden pro Porositätsbestimmung 20 bis 30 Segmente genutzt.

Für die eigentliche Bestimmung der Porosität wurden die Segmente gewogen. Eine 60 ml-Schliffflasche wurde vollständig mit Wasser gefüllt, verschlossen und ein Haken mittels Angelsehne angebracht. Ein weiterer Haken wurde mit Angelsehne an der Unterflurwägeeinrichtung einer Feinwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) angebracht. Die Flasche wurde an die Waage gehängt und dabei darauf geachtet, dass sie vollständig von Wasser in einem 2,5 l-Becherglas umgeben war. Die Waage wurde tariert, die Segmente ohne Luftblasen in die Flasche gegeben, verschlossen und anschließend das Gewicht bestimmt. Jeweils zehn Segmente wurden in 25 ml-Plastikbecher mit 10 ml Wasser gegeben und in einer Vakuumzentrifuge das Wasser unter Anlegen von dreimal fünf Minuten Vakuum in das Gewebe infiltriert. Es erfolgte eine weitere Bestimmung des Gewichts unter Wasser und die Porosität wurde berechnet (Abbildung 2).

$$\text{Porosität [\%]} = 100 \cdot \frac{m_2 - m_1}{FG - m_1}$$

Abbildung 2: Formel zur Berechnung der Porosität bei der auftriebsbasierten Methode. FG entspricht dem Frischgewicht der Segmente, m_1 dem Gewicht der Segmente vor und m_2 dem Gewicht der Segmente nach der Vakuuminfiltration (Visser und Bögemann, 2003).

Für die Porositätsbestimmung durch die Querschnittsanalyse nach Visser und Bögemann (2003) wurden Reispflanzen des Kultivars PG56 für drei Tage partiell geflutet und in den ersten drei Internodien im Abstand von 1, 2, 3 und 4 cm über den unteren Knoten Querschnitte gemacht. Fotos dieser Querschnitte wurden aufgenommen und mit der Bildanalysesoftware ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA) ausgewertet. Hierfür wurde die Gesamtfläche des Internodienquerschnitts (A_{ges}), die Fläche des Gewebes (A_{Gewebe}), der Lakune (A_{Lakune}) und der

Aerenchyme ($A_{\text{Aerenchym}}$) ausgemessen. Der prozentuale Anteil der Lakune und der Aerenchyme an der Gesamtfläche oder der Gewebefläche wurde berechnet (Abbildung 3).

$$\text{Porosität [\%]} = 100 \cdot \frac{A_{\text{Lakune, Aerenchym}}}{A_{\text{ges, Gewebe}}}$$

Abbildung 3: Formel zur Berechnung der Porosität durch Querschnittsanalyse. Die Berechnung ergibt sich aus den gemessenen Flächen der Lakune (A_{Lakune}), der Aerenchyme ($A_{\text{Aerenchym}}$), des Gewebes (A_{Gewebe}) und des Gesamtquerschnitts des Internodiums (A_{ges}) (modifiziert nach Visser und Bögemann, 2003).

Die Visualisierung von Hohlräumen im Reisknoten wurde mit Bromphenolblau durchgeführt. Für die Analyse wurden Stängelsegmente des Kultivars PG56 vom zweitjüngsten Internodium mit einer 5 ml-Einmalspritze und einer Einmal-Injektions-Kanüle mit einem Durchmesser von 0,40 mm und einer Länge von 20 mm mit einer 0,01%-igen (w/v) Bromphenolblau-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllt. Hierfür wurde mit der Kanüle 5 mm unterhalb des zweiten Knotens in das Internodium eingestochen. Anschließend wurde es mit 0,8 bis 1,2 ml Farblösung vollständig gefüllt. Die Lösung drang in alle Luft-gefüllten Räume ein und färbte mögliche Verbindungen der Hohlräume an. Es wurden Quer- sowie Längsschnitte des dritten Knotens unter einem Binokular betrachtet und dokumentiert.

Charakterisierung der Präaerenchymzellen

Die Untersuchungen zum DNA-Abbau und der Mitochondrien wurden am Kultivar PG56 im zweitjüngsten Internodium 1 cm über dem dritten Knoten durchgeführt.

Nachweis des DNA-Abbaus durch Gelelektrophorese

DNA wurde aus Stängelsegmenten, die für zwei, vier, acht, 24 und 48 Stunden mit 150 μM Ethephon behandelt wurden, isoliert. Kontrollen

wurden in destilliertem Wasser inkubiert. Es wurden 2 mm-Segmente aus dem zu untersuchenden Bereich isoliert und jeweils 15 Segmente für einen Versuchsansatz verwendet. Die Segmente wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml Cetyltrimethylammoniumbromid-Puffer aus 140 mM Sorbitol, 220 mM Tris-HCl (pH 8,0), 22 mM EDTA, 800 mM NaCl, 1% (w/v) N-Lauroylsarcosine und 0,8% (w/v) CTAB (pH 8,0) versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 65°C und gelegentlichem Invertieren des Gefäßes wurden 400 µl Chloroform (Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben und gut vermischt. Eine Phasentrennung wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 1000 x g erreicht. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 700 µl Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. DNA wurde durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 10000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 160 µl Tris-EDTA-Puffer aus 10 mM Tris (pH 8,0) und 1 mM EDTA aufgenommen und mit 2 µl RNase A (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 16 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 80 µl Phenol/Chloroform (1:1; Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 10000 x g wurde die obere Phase in ein neues Gefäß überführt und 80 µl Chloroform auf die untere Phase gegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurden beide obere Phasen vereinigt, mit 360 µl Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und die DNA auf Eis für fünf Minuten gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 10000 x g pelletiert und mit 500 µl 70%-igem (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und die DNA in 20 µl Tris-EDTA-Puffer aufgenommen. Die gesamte DNA wurde auf einem 1%-igen (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

Nachweis des DNA-Abbaus mit der TUNEL-Methode

Für diesen Nachweis wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums für 24 Stunden mit 150 μM Ethephon behandelt. Kontrollen wurden in destilliertem Wasser inkubiert. Es wurden 80 μm dicke Querschnitte mit einem Vibratom (Leica, Bensheim, Deutschland) 1 cm über dem dritten Knoten geschnitten, in 70% (v/v) Ethanol aufgenommen und in 100% (v/v) Ethanol für fünf Minuten gewaschen. Der TUNEL-Nachweis wurde mit dem DeadEndTM Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden nach schrittweiser Rehydrierung die Querschnitte zuerst in 0,85% (w/v) NaCl und danach in PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4) für jeweils fünf Minuten gewaschen. Es folgte eine Fixierung in 4% (w/v) Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in PBS-Puffer für 15 Minuten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurde die Flüssigkeit entfernt, 20 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K zu jeder Probe gegeben und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS-Puffer, Fixieren in 4% (w/v) Paraformaldehyd und weiterem Waschen in PBS-Puffer wurde die Flüssigkeit entfernt und die Querschnitte in Equilibrierungs-Puffer (200 mM Kaliumcacodylat (pH 6,6), 25 mM Tris-HCl (pH 6,6), 0,2 mM DTT 0,25 mg/ml BSA, 2,5 mM Kobaltchlorid) aufgenommen und zehn Minuten inkubiert. Positivkontrollen wurden vor der Behandlung mit Equilibrierungs-Puffer mit 10 units/ml DNase I (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach viermal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Querschnitte wurden mit Reaktionslösung versehen und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Die Reaktionslösung bestand aus Equilibrierungs-Puffer, Nukleotid-Mix und der rekombinanten, terminalen Desoxyribonukleotidyl-Transferase (rTdT). Für die Negativkontrollen wurde destilliertes Wasser statt rTdT hinzugefügt. Die Reaktion wurde mit 2x SSC (133 mM NaCl, 34 mM Natriumcitrat) gestoppt und die Querschnitte dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid

(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) angefärbt und die Querschnitte nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) analysiert. Die Fluoreszenz der Fluorescein-markierten DNA-Enden wurde bei 485 nm angeregt und bei 520 ± 20 nm detektiert. Propidiumiodid wurde bei 535 nm angeregt und die Fluoreszenz bei >620 nm nachgewiesen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die ultrastrukturelle Charakterisierung der Mitochondrien von Präaerenchym- und Parenchymzellen wurden 5 mm lange Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums hergestellt und wie in Kapitel 1 behandelt. Die Segmente beinhalteten den zu untersuchenden Bereich des Internodiums von 1 cm über dem dritten Knoten. Die Segmente wurden fixiert, dehydriert und in LRwhite eingebettet (durchgeführt von der Zentralen Mikroskopie, Botanisches Institut, CAU Kiel). 60 nm bis 80 nm dicke Querschnitte wurden mit dem Leica Ultracut UCT (Leica, Wetzlar, Deutschland) hergestellt und mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai BioTWIN, Fei Company, Eindhoven, Niederlande) analysiert.

Analyse der Mitochondrienbewegung

Für die Untersuchung der Mitochondrienbewegung wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums für 24 Stunden mit $150 \mu\text{M}$ Ethephon (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) behandelt. Kontrollen wurden in destilliertem Wasser inkubiert. Es wurden $80 \mu\text{m}$ dicke Querschnitte mit einem Vibratom (Leica, Bensheim, Deutschland) 1 cm über dem dritten Knoten geschnitten. Die Querschnitte wurden nach Herstellerangaben für eine Stunde mit $1 \mu\text{M}$ MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, Karlsruhe Deutschland) bei Raumtemperatur behandelt. Nach achtmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Proben weitere 90 Minuten in destilliertem Wasser inkubiert und danach an einem

konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) analysiert. MitoTracker wurde bei 543 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 570 nm bis 610 nm zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ min detektiert und mit einer Kamera dokumentiert. Es wurden nach $t_1 = 2$ min weitere Bilder derselben Zellen aufgenommen und später die Bilder überlagert, um die Mitochondrienbewegung zu visualisieren. Die Mitochondrien einer Zelle wurden ausgezählt und die Bewegungen dokumentiert. Daraus wurde der prozentuale Anteil an bewegten Mitochondrien pro Zelle berechnet.

Untersuchungen des mitochondrialen Transmembranpotentials

Für die Untersuchung des mitochondrialen Transmembranpotentials in Zellen 1 cm über dem dritten Knoten wurden 80 μm dicke Querschnitte verwendet, die mit einem Vibratom geschnitten wurden. Die Internodienquerschnitte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% (v/v) Dimethylsulfoxid inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal in Puffer aus 10 mM HEPES (pH 7,2), 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 und 0,6 M Sorbitol gewaschen und danach 30 Minuten bei 37°C in 10 $\mu\text{g/ml}$ 5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1; Biomol, Hamburg, Deutschland) in Puffer inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit Puffer wurden die Querschnitte an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) analysiert. JC-1 wurde bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenz von JC-1-Monomeren bei 520 nm bis 540 nm und von JC-1-Aggregaten bei 580 nm bis 600 nm detektiert. Durch den Aggregationsgrad zeigte der Farbstoff indirekt das Transmembranpotential der Mitochondrien an (van Ginkel *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Product Technical Information Sheet, AAT Bioquest[®], Inc., 2012). Bei einem negativen Membranpotential aggregierten die JC-1-Moleküle und emittierten eine rote Fluoreszenz. Bei einem depolarisierten Potential verblieben die Farbstoffmoleküle als Monomere und eine grüne Fluoreszenz konnte detektiert werden. Eine gelbe Fluoreszenz resultierte aus der Depolarisation des Transmembranpotentials und stellte eine Mischfluoreszenz dar. Zellen des

Präaerenchym und des Parenchyms wurden nach der überwiegenden Fluoreszenzfarbe, und damit dem überwiegendem Membranpotential der Mitochondrien, unterteilt. Des Weiteren wurde bestimmt, wie viele Zellen aggregierte Mitochondrien aufwiesen.

Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte über Minitab (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA). Ergebnisse in Prozent wurden vor der Auswertung mit der Rechnung $\arcsin(\sqrt{x/100})$ transformiert. Die Werte wurden auf Normalverteilung und Varianz hin untersucht. War eine dieser Bedingungen nicht gegeben, wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P \leq 0,001$ angenommen. Anderenfalls lag die Fehlerwahrscheinlichkeit bei $P \leq 0,05$. Die statistische Analyse von zwei Gruppen wurde mit einem zweiseitigen t-Test oder Vergleiche mehrerer Gruppen mit einer ANOVA (Tukey-Test) durchgeführt. In den Abbildungen sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler (\pm SE) angegeben.

Ergebnisse

Die Injektion von Wasser in die Lakune hat keinen Einfluss auf die Aerenchymbildung

Überflutung und das Phytohormon Ethylen fördern die Aerenchymbildung in Internodien von Reis (Kapitel 1). Um zu analysieren, welchen Effekt die Flutung der Lakune hervorruft, wurden Lakunen von Stängelsegmenten des zweitjüngsten Internodiums mit Wasser oder 150 μM Ethepon gefüllt. Ethepon ist eine wasserlösliche Substanz, die durch den cytologischen pH zu Ethylen und Phosphorsäure zerfällt (Cooke und Randall, 1968). Daraus resultiert eine erhöhte Konzentration des Phytohormons innerhalb des Gewebes. Kontrollstängeln wurde keine Lösung in die Lakune injiziert. Zusätzlich wurden die Stängelsegmente in Wasser oder in 150 μM Ethepon für drei Tage inkubiert.

Die Injektion von Wasser in die Lakune führte zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung der Aerenchymbildung im Internodium (Abbildung 4A). In die Lakune appliziertes Ethepon induzierte innerhalb von drei Tagen eine signifikante Zunahme der Aerenchymbildung von 48% auf 95%. Ethepon förderte bei allen Behandlungen eine statistisch signifikante Zunahme der Aerenchyme im Vergleich zur Kontrolle. Die Injektion von Wasser in die Lakune von Reisstängeln hatte keinen Einfluss auf die Aerenchymbildung. Die Responsivität der Präaerenchymzellen zu von außen appliziertem Ethepon blieb erhalten.

Drei Tage Hypoxie induziert die Aerenchymbildung nicht

Um zu überprüfen, ob Hypoxie allein die Bildung von Aerenchymen in Reisinternodien beeinflusst, wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums für drei Tage mit 5% Sauerstoff oder zur Kontrolle mit 21% Sauerstoff inkubiert und Aerenchyme 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt. Hypoxische Bedingungen führten zu einer Zunahme der Aerenchyme von 34% auf 56%, die nicht statistisch signifikant war (Abbildung 4B). Während der Überflutung akkumuliert Ethylen in

Internodien (Métraux und Kende, 1983; Raskin und Kende, 1984a; Jackson, 1985; Stünzi und Kende, 1989). Während der Behandlung wurde die Atmosphäre alle vier Stunden erneuert und dadurch eventuell angereichertes Ethylen entfernt. Nach drei Tagen induzieren 5% Sauerstoff ohne Ethylen die Aerenchymbildung im Internodium nicht signifikant.

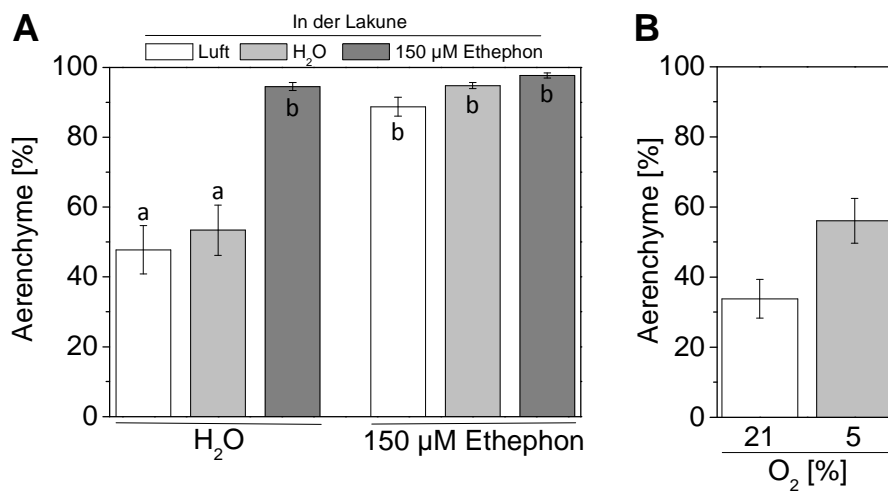


Abbildung 4: Aerenchymbildung wird nicht durch Wasser in der Lakune oder durch drei Tage Hypoxie induziert. Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums des Kultivars PG56 wurden für drei Tage behandelt und Aerenchyme 1 cm über dem 3. Knoten bestimmt. **A** Mittelwerte (\pm SE) der Aerenchym [%] von Stängelsegmenten, in deren Lakune Wasser oder 150 μ M Ethephon injiziert und bei denen über den Transpirationsstrom Wasser oder 150 μ M Ethephon aufgenommen wurde. Die Werte ergaben sich aus Zählungen von 23 bis 25 Stängelsegmenten aus drei biologischen Replikaten. Es wurde eine ANOVA (Tukey-Test) durchgeführt ($P \leq 0,001$). Signifikant unterschiedliche Werte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. **B** Mittelwerte (\pm SE) der Aerenchym [%] von Stängelsegmenten, die in einer Atmosphäre mit 21% oder 5% Sauerstoff inkubiert wurden. Es wurden 34 Stängelsegmente von drei biologischen Replikaten ausgewertet. Ein t-Test wurde durchgeführt ($P \leq 0,001$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen mit Normoxie oder Hypoxie behandelten Segmenten.

Trockenstress induziert die Aerenchymbildung in Reisinternodien

Neben der Überflutung gibt es weitere abiotische Faktoren, die zur Induktion der Aerenchymbildung führen. Sieben Tage Trockenstress führt zum Beispiel zu einer Zunahme der Aerenchyme in Adventivwurzeln von Reis (Yang *et al.*, 2012).

Für die Untersuchung des Einflusses von Trockenstress auf die Aerenchymbildung in Internodien wurden elf bis 14 Wochen alte Pflanzen für sieben Tage Wassermangel ausgesetzt. Nach drei bis vier Tagen waren die Töpfe ausgetrocknet. Kontrollpflanzen wurden weiter versorgt. Die Aerenchyme wurden 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt. Trockenstress induzierte eine statistisch signifikante Aerenchymbildung in den Internodien von 48% auf 82% (Abbildung 5A).

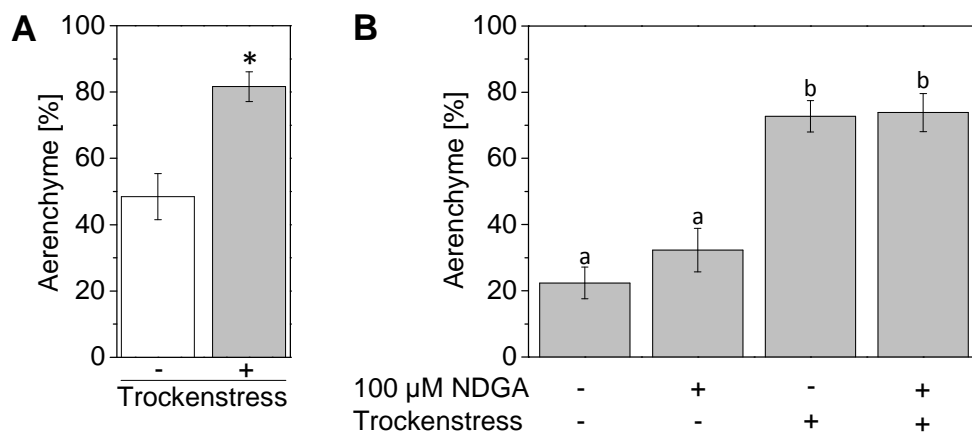


Abbildung 5: Trockenstress induziert die Aerenchymbildung. **A** Pflanzen des Kultivars PG56 wurden für sieben Tage bewässert (weißer Balken) oder Trockenstress ausgesetzt (grauer Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SE) der Aerenchyme [%] aus dem zweitjüngsten Internodium 1 cm über dem dritten Knoten. Die Werte ergaben sich aus 24 oder 25 Stängeln von drei biologischen Replikaten. Es wurde ein t-Test durchgeführt ($P \leq 0,001$). Der Stern kennzeichnet eine signifikante Induktion der Aerenchymbildung durch Trockenstress. **B** Stängelsegmente des Kultivars PG56 des zweitjüngsten Internodiums wurden mit 100 µM des ABA-Biosynthese-Inhibitors NDGA oder Wasser für 24 Stunden vorbehandelt und dann für drei Tage in Wasser inkubiert oder Trockenstress ausgesetzt. Die Aerenchyme [%] wurden 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SE) von 24 bis 25 Segmenten aus drei biologischen Replikaten. Es wurde eine ANOVA (Tukey-Test) durchgeführt ($P \leq$

0,001). Trockenstress führt zu einer NDGA-unabhängigen, signifikanten Induktion der Aerenchymbildung.

In Reis führt Trockenstress zu einer Akkumulation von Abscisinsäure (ABA) in Blättern (Sauter *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2011) und Internodien (Muthurajan *et al.*, 2011). Um zu untersuchen, ob die durch Trockenstress ausgelöste Aerenchymbildung im Internodium ABA-abhängig ist, wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums für einen Tag mit dem ABA-Biosynthese-Inhibitor Nordihydroguaiaretische Säure (NDGA) in der Konzentration von 100 μM inkubiert und dann für drei Tage Wassermangel-Bedingungen ausgesetzt. Hierfür wurden die Stängel ohne oder mit Wasser inkubiert. Trockenstress führte zu einer signifikanten Zunahme der Aerenchymbildung von 22% beziehungsweise 32% auf 73% unabhängig von der Zugabe des Inhibitors (Abbildung 5B).

Trockenstress könnte die Aerenchymbildung ABA-unabhängig induzieren. Die ABA-Biosynthese in Mais (Ren *et al.*, 2007) und Reis (Ye *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2009) konnte bereits mit NDGA in einer Konzentration von 100 μM inhibiert werden. Inkubation von Reisinternodien mit dieser Konzentration hatte keinen Einfluss auf die Trockenstress-induzierte Aerenchymentwicklung. Dies lässt vermuten, dass entweder die Konzentration des Inhibitors nicht ausreichend war oder die Aerenchymbildung ABA-unabhängig ist.

Abscisinsäure kann die Ethylen-induzierte Aerenchymbildung fördern

Der Einfluss von Gibberellinsäure (GA) und ABA auf die Ethylen-induzierte Aerenchymbildung in Reisinternodien wurde an Stängelsegmenten des zweitjüngsten Internodiums des Kultivars PG56 untersucht. Die Segmente wurden mit unterschiedlichen Kombinationen an 30 μM GA, 10 μM ABA und 50 μM Ethephon für zwei Tage inkubiert. Die optimalen Konzentrationen der verwendeten Hormone wurden in vorangegangenen

Untersuchungen ermittelt (unveröffentlicht, Bachelor-Arbeit, Daniela I. Lux, 2010).

Bei alleiniger Applikation von GA oder ABA kam es zu keiner signifikanten Zunahme der Aerenchymbildung (Abbildung 6). Inkubation mit 50 μM Ethephon erhöhte die Aerenchymbildung signifikant von 37% in Kontrollen auf 70% (t-Test, $P \leq 0,001$) und in Kombination mit GA auf 73%. Gleichzeitige Applikation von Ethephon mit ABA führte zu einer Zunahme der Aerenchyme auf 95%. Diese Erhöhung war im Vergleich mit der Ethephon-induzierten Zunahme statistisch nicht signifikant (t-Test, $P \leq 0,001$). Bei zusätzlicher Zugabe von GA blieb die Aerenchymbildung unverändert bei 95%. Aufgrund der Zunahme der Aerenchymbildung könnte die Ethylen-induzierte Aerenchymbildung durch ABA gefördert worden sein. GA hat keinen Einfluss auf die Aerenchymentwicklung.

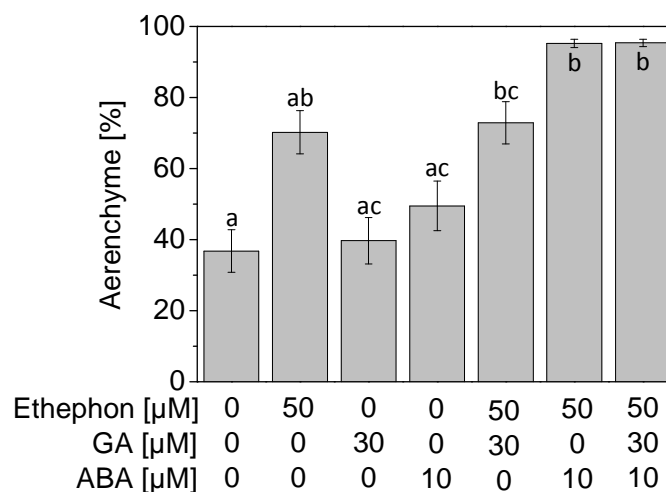


Abbildung 6: Die Ethylen-induzierte Aerenchymbildung wird durch Abscisinsäure erhöht. Mittelwerte (\pm SE) der Aerenchyme [%] aus Analysen von drei biologischen Wiederholungen von 22 bis 25 Stängelsegmenten des Kultivars PG56, die für zwei Tage mit 50 μM Ethephon, 30 μM GA und 10 μM ABA inkubiert wurden. Die Aerenchyme wurden im zweitjüngsten Internodium 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt. Es wurde eine ANOVA (Tukey-Test) durchgeführt ($P \leq 0,001$). Signifikant unterschiedliche Werte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Ethephon erhöht statistisch signifikant die Aerenchymbildung (t-Test, $P \leq 0,001$, nicht dargestellt). Die Zunahme der Aerenchyme durch gleichzeitige Applikation von Ethephon und ABA ist im Vergleich zur Ethephonbehandlung nicht signifikant (t-Test, $P \leq 0,001$, nicht dargestellt).

Polarer Auxintransport ist in die Ethylen-induzierte Aerenchymbildung involviert

Auxin und der polare Transport dieses Hormons spielen eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Entwicklung. Der Einfluss von Auxin auf die Aerenchymbildung in Wurzeln wurde an Maiskeimlingen untersucht (Konings und de Wolf, 1984; Justin und Armstrong, 1991). Das synthetische Auxin 1-Naphthyllessigsäure (1-NAA) inhibiert die Hypoxie-induzierte Aerenchymbildung im Kortex in Konzentrationen zwischen 100 nM und 10 μ M (Konings und de Wolf, 1984). Geringere Konzentrationen zwischen 10 nM und 1 nM 1-NAA können die Aerenchymentwicklung fördern (Justin und Armstrong, 1991).

Der Einfluss von Auxin und dessen Transport auf die Aerenchymbildung in Reisinternodien wurde an Stängelsegmenten des zweitjüngsten Internodiums untersucht. Die Aerenchyme wurden 1 cm über dem dritten Knoten analysiert. Für die Untersuchung der Wirkung von Auxin wurden Segmente für zwei Tage mit 150 μ M Ethephon in An- und Abwesenheit von 1 μ M 1-NAA inkubiert (Abbildung 7A). Ethephon induzierte die Aerenchymbildung signifikant von 66% auf 96%. Zusätzliche Applikation von 1-NAA hatte mit 94% gebildeten Aerenchymen keine Auswirkungen auf die Ethylen-induzierte Aerenchymentwicklung in den Internodien.

Der Einfluss des Auxintransports auf die Aerenchymbildung in Reisinternodien wurde an Stängelsegmenten untersucht, die für zwei Tage ohne oder mit 150 μ M Ethephon und in An- oder Abwesenheit von 10 μ M des Auxintransport-Inhibitors 1-N-Naphthylphtalaminsäure (NPA) inkubiert wurden. NPA ist ein spezifischer Inhibitor der PIN-Proteine. Diese Efflux-Carrier vermitteln den polaren Auxintransport (Friml und Palme, 2002). Ethephon führte zu einer signifikanten Zunahme der Aerenchyme in den Internodien von 46% konstitutiv angelegten Aerenchymen in den Kontrollen auf 89% in den Ethephon-behandelten Segmenten (Abbildung 7B). NPA alleine veränderte die Bildung der Aerenchyme nicht signifikant. Gleichzeitige Applikation von Ethephon und NPA führte zu einer signifikanten Verringerung des Ethylen-induzierten

Effekts um 27% auf 62% Aerenchyme (t-Test, $P \leq 0,001$). Ethylen-induzierte Aerenchymbildung im Internodium ist vom polaren Auxintransport abhängig und damit Auxin-vermittelt.

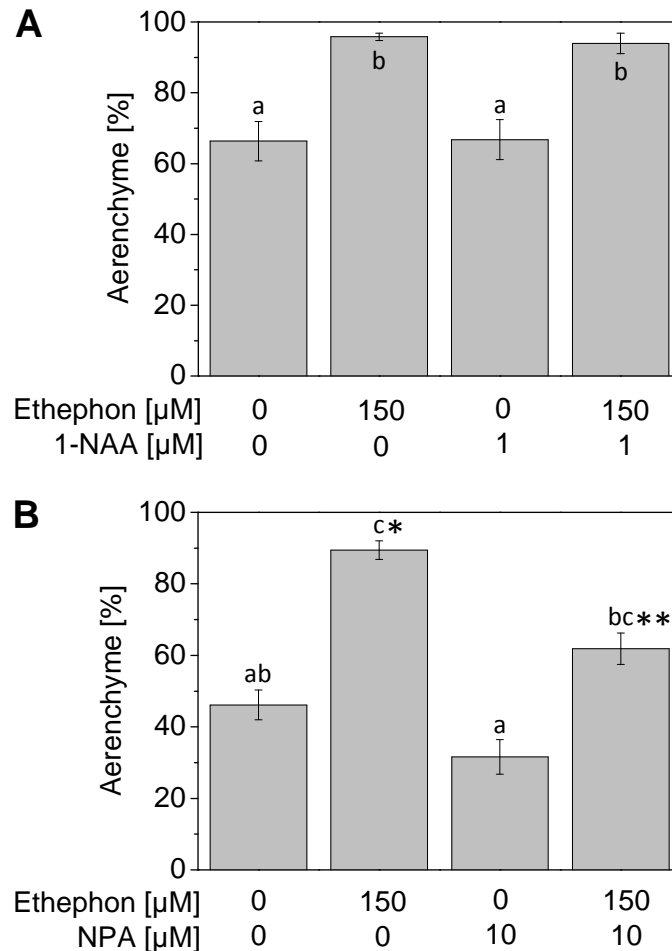


Abbildung 7: Inhibition des Auxintransports verringert die Ethylen-induzierte Aerenchymbildung. Stängelsegmente des Kultivars PG56 wurden für zwei Tage mit 150 μM Ethephon und 1 μM 1-NAA (**A**) oder 10 μM NPA (**B**) inkubiert. Die Aerenchyme wurden im zweitjüngsten Internodium 1 cm über dem dritten Knoten gezählt. **A** Mittelwerte (\pm SE) der Aerenchyme [%] von 24 Stängelsegmenten aus drei biologischen Replikaten. **B** Mittelwerte (\pm SE) der Aerenchyme [%] aus Zählungen von 48 bis 50 Stängelsegmenten aus sechs biologischen Replikaten. Bei den durch einen Stern gekennzeichneten Werten wurde ein t-Test durchgeführt ($P \leq 0,001$). NPA inhibiert die Ethylen-induzierte Aerenchymbildung signifikant. **A + B** Es wurde jeweils eine ANOVA (Tukey-Test) durchgeführt ($P \leq 0,001$). Signifikant unterschiedliche Werte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Inhibierung der Superoxidanion-Radikal-Produktion durch NADPH-Oxidase induziert Aerenchymbildung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) fördern in Reis epidermalen Zelltod über Wurzelanlagen (Steffens und Sauter, 2009a), die lysigene Aerenchymbildung in Maiswurzeln (Yamauchi *et al.*, 2011) und die Aerenchymbildung in Reisinternodien (Kapitel 1). ROS werden zum Beispiel über die Plasmamembran-ständige NADPH-Oxidase produziert (Blokhina *et al.*, 2003; Gill und Tuteja, 2010; Suzuki *et al.*, 2011). Das Enzym katalysiert die Reaktion von NADPH und molekularem Sauerstoff zu NADP^+ und $\text{O}_2^{\bullet-}$. NADPH-Oxidase kann durch Diphenylen Iodonium (DPI) inhibiert werden (Bolwell und Wojtaszek, 1997). Der Einfluss der NADPH-Oxidase-abhängigen ROS-Produktion auf die Aerenchymbildung im Reisinternodium wurde an Stängelsegmenten des zweitjüngsten Internodiums untersucht. Segmente wurden für drei Tage ohne oder mit 150 μM Ethephon und 1 μM DPI inkubiert und die Aerenchyme 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt. Inkubation mit DPI allein erhöhte die Aerenchymbildung signifikant von 49% in Kontrollen auf 77% (Abbildung 8). Ethephon führte, unabhängig von der Inhibierung der NADPH-Oxidase, zu einer Zunahme der Aerenchyme auf 98%. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Inhibierung der $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Synthese über die Plasmamembran-ständige NADPH-Oxidase die Aerenchymbildung fördert und die Ethylen-abhängige Aerenchymentwicklung durch $\text{O}_2^{\bullet-}$ inhibiert werden könnte.

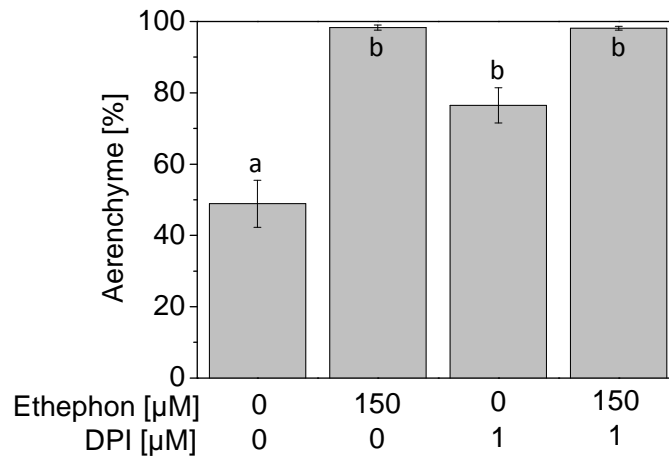


Abbildung 8: Inhibierung der NADPH-Oxidase induziert die Aerenchymbildung.

Stängelsegmente des Kultivars PG56 wurden für drei Tage ohne oder mit 150 μM Ethephon und in An- oder Abwesenheit von 1 μM DPI inkubiert. Die Aerenchyme wurden im zweitjüngsten Internodium 1 cm über dem dritten Knoten gezählt. Mittelwerte (\pm SE) der Aerenchyme [%] aus Zählungen von 22 Stängelsegmenten aus drei biologischen Replikaten. Es wurde eine ANOVA (Tukey-Test) durchgeführt ($P \leq 0,001$). Signifikant unterschiedliche Werte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Wasserstoffperoxid induziert die Aerenchymbildung

Die Entgiftung von ROS erfolgt enzymatisch, zum Beispiel über die Superoxid-Dismutase und Katalase, oder nicht-enzymatisch, zum Beispiel über Ascorbinsäure und Metallothioneine (Gill und Tuteja, 2010). In Reis bindet das Metallothionein MT2b H_2O_2 mit hoher Affinität und dient somit als ROS-Fänger (Wong *et al.*, 2004). In *Knockdown*-Pflanzen von *MT2b* liegt eine endogen erhöhte H_2O_2 -Konzentration vor. Um zu analysieren, ob endogen erhöhte H_2O_2 -Gehalte die Bildung konstitutiver Aerenchyme beeinflussen, wurden Pflanzen des Wildtyps und von *OsMT2b::Tos17* des Kultivars Nipponbare genutzt. Es wurden in den ersten drei Internodien die Aerenchyme 1, 2, 3 und 4 cm über dem jeweiligen basalen Knoten bestimmt. In Pflanzen des Wildtyps und von *OsMT2b::Tos17* wurde in jedem Internodium eine altersabhängige Zunahme der Aerenchyme festgestellt (Abbildung 9A). Im Wildtyp waren im zweiten Internodium zwischen 8,6% Aerenchyme bei 1 cm und 26,3% Aerenchyme bei 4 cm

über dem dritten Knoten konstitutiv angelegt und in Pflanzen von *OsMT2b::Tos17* zwischen 10,6% und 37%. In *OsMT2b::Tos17*-Pflanzen waren im ersten und zweiten Internodium konstitutiv mehr Aerenchyme vorhanden als im Wildtyp. Im dritten Internodium 1 cm über dem vierten Knoten waren mit 12,3% weniger Aerenchyme gebildet als im Wildtyp mit 16,9%.

Zusätzlich erfolgte die endogene Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration über die Inhibierung der Katalase mit 3-Amino-1,2,4-triazol (AT). Es wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums des Kultivars PG56 für drei Tage mit 50 μ M Ethephon, 200 mM AT und 5 ppm des Inhibitors der Ethylenperzeption 1-Methylcyclopropen (1-MCP) in verschiedenen Kombinationen behandelt. Durch Inhibition des Ethylen-Signalwegs kann untersucht werden, ob die ROS-vermittelte Aerenchyembildung Ethylen-abhängig ist. Es wurden die Aerenchyme 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt. Die statistisch signifikante Erhöhung der Aerenchyembildung durch Ethephon um 38% wurde durch 5 ppm 1-MCP auf 41% inhibiert (Abbildung 9B). AT führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Aerenchymentwicklung von 46% in Kontrollen auf 73% (t-Test, $P \leq 0,001$) ohne 1-MCP und zu 62% mit 1-MCP. Gemeinsame Applikation von Ethephon und AT induzierte 94% Aerenchyme. Bei Vorbehandlung mit 1-MCP wurden 64% Aerenchyme gebildet. Die verminderte Induktion der Aerenchyembildung war statistisch signifikant (t-Test, $P \leq 0,001$).

Der Einfluss von exogen appliziertem H_2O_2 auf die Aerenchyembildung wurde an Stängelsegmenten des Tiefwasserreis-Kultivars PG56 untersucht (Kapitel 1). 3% (v/v) H_2O_2 erhöhte die Aerenchyembildung nach drei Tagen statistisch signifikant. Für die Untersuchung, ob die Induktion der Aerenchyembildung durch H_2O_2 Ethylen-abhängig ist, wurden Segmente des zweitjüngsten Internodiums mit 150 μ M Ethephon, 3% (v/v) H_2O_2 und 5 ppm 1-MCP in verschiedenen Kombinationen für drei Tage behandelt. Aerenchyme wurden 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt. Die Ethylen-induzierte Aerenchyembildung auf 99% wurde durch Vorinkubation mit 1-MCP auf 32% Aerenchyme inhibiert (Abbildung 9C).

Exogen appliziertes H₂O₂ führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Aerenchyme von 38% in Kontrollen auf 91%. Bei H₂O₂-Behandlung in Anwesenheit des Ethylenperzeption-Inhibitors 1-MCP wurden 80% Aerenchyme gebildet. Das Ergebnis zeigt, dass eine exogene Erhöhung der Wasserstoffperoxid-Konzentration zu einer Ethylen-unabhängigen Erhöhung der Aerenchyembildung in den Internodien führt und daher die H₂O₂-induzierte Aerenchymentwicklung dem Ethylen nachgeschaltet ist.

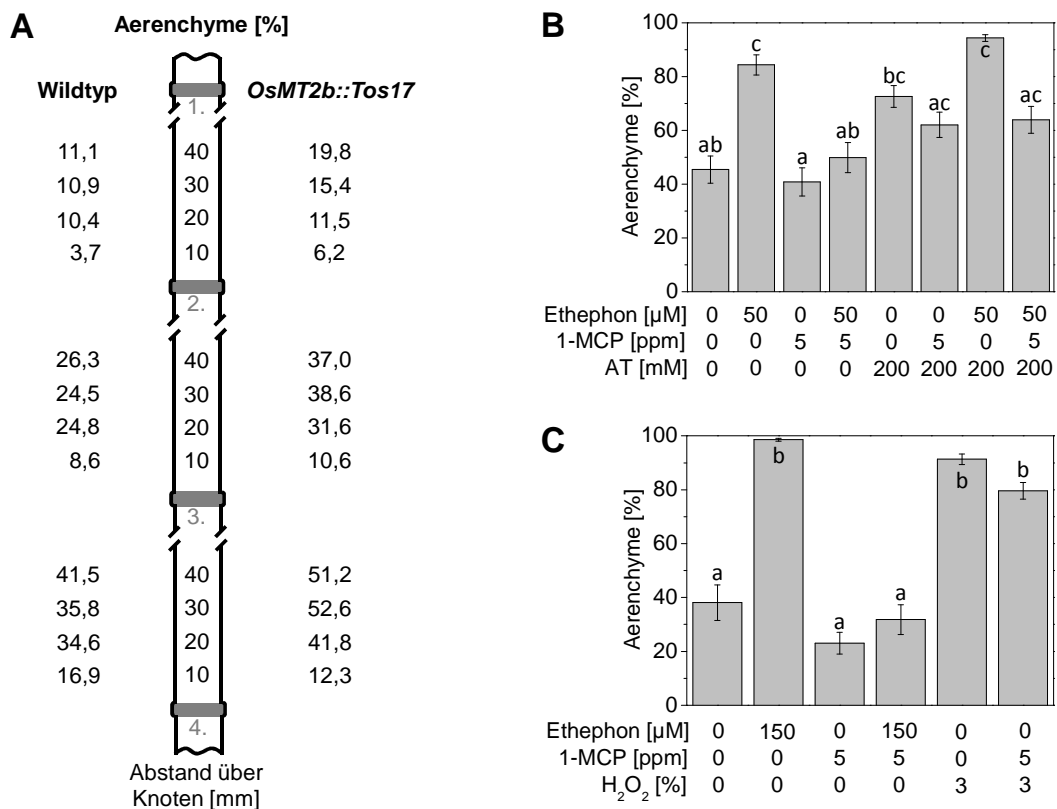


Abbildung 9: Wasserstoffperoxid induziert die Aerenchyembildung. **A** Mittelwerte der Aerenchyme [%] von Wildtyp- und *OsMT2b::Tos17*-Pflanzen des Flachlandreis-Kultivars Nipponbare. Es wurden jeweils die Aerenchyme 10, 20, 30 und 40 mm über dem 2., 3. und 4. Knoten gezählt. Die Standardfehler der Mittelwerte liegen zwischen 2,9% und 8,1%. Die Aerenchyme wurden von 14 bis 20 Stängeln aus zwei biologischen Replikaten ermittelt. **B + C** Stängelsegmente des Kultivars PG56 wurden für drei Tage behandelt. Aerenchyme wurden im zweitjüngsten Internodium 1 cm über dem dritten Knoten gezählt. **B** Mittelwerte (± SE) der Aerenchyme [%] von Stängelsegmenten, die mit 50 μM Ethephon, 5 ppm 1-MCP und 200 mM AT in verschiedenen Kombinationen behandelt wurden. **C** Mittelwerte (± SE) der Aerenchyme [%] von Stängelsegmenten, die mit 150 μM Ethephon, 5 ppm 1-MCP und 3% (v/v) H₂O₂ in verschiedenen Kombinationen

behandelt wurden. **B + C** Alle Mittelwerte stammen aus Zählungen von 24 oder 25 Segmenten aus drei biologischen Replikaten. Es wurde jeweils eine ANOVA (Tukey-Test) durchgeführt ($P \leq 0,001$). Signifikant unterschiedliche Werte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Superoxidanionen inhibieren die Aerenchymbildung in Internodien

Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert die Umsetzung von $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 und kann durch Diethyldithiocarbamat (DDC) inhibiert werden (Bolwell *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011). Durch eine Inhibition der SOD wird $O_2^{\bullet-}$ endogen angereichert. Um die Rolle von endogen erhöhten $O_2^{\bullet-}$ -Gehalten in der Aerenchymbildung zu analysieren, wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums für drei Tage mit 150 μ M Ethephon, 3% (v/v) H_2O_2 und 100 mM DDC (nach Hwang *et al.*, 2004) in verschiedenen Kombinationen behandelt. Die Aerenchyme wurden 1 cm über dem dritten Knoten bestimmt.

Die mit DDC behandelten Stängel wiesen nach drei Tagen eine schwache Braunfärbung des umgebenen Blattes und der Epidermis auf (Abbildung 10A). Wasserstoffperoxid führte zu einem Ausbleichen der Stängelsegmente (Abbildung 10A; Steffens *et al.*, 2009a). Bei Kombination von DDC und H_2O_2 wiesen die Segmente eine stärkere Bleichung und Braunfärbung des Gewebes auf. Ethephon und H_2O_2 induzierten die Aerenchymbildung von 62% in Kontrollen auf 98% beziehungsweise 94% (Abbildung 10B). DDC allein oder in Kombination mit Ethephon und H_2O_2 führte zu 16% bis 26% Aerenchyme. Diese verminderte Aerenchymbildung und die fehlende Induktion durch Ethylen oder H_2O_2 legten den Schluss nahe, dass die Präaerenchymzellen sehr schnell durch das $O_2^{\bullet-}$ abgetötet worden sein könnten. Dieses wurde über eine Zelltoadfärbung mit Evans Blau untersucht. Bei allen Behandlungen war ein Großteil der Präaerenchymzellen lebendig (Abbildung 10C). Nur vereinzelt war, wie in unbehandelten Kontrollsegmenten, eine tote Zelle im Präaerenchym zu erkennen.

Die Aerenchymbildung wird durch $O_2^{\bullet-}$ inhibiert. Aufgrund der hohen Reaktivität des $O_2^{\bullet-}$ könnten die Komponenten der Signaltransduktion irreversibel geschädigt worden sein oder die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration war im Gewebe durch die Inhibierung der SOD so hoch, dass keine Restauration durch Ethylen oder H_2O_2 möglich war.

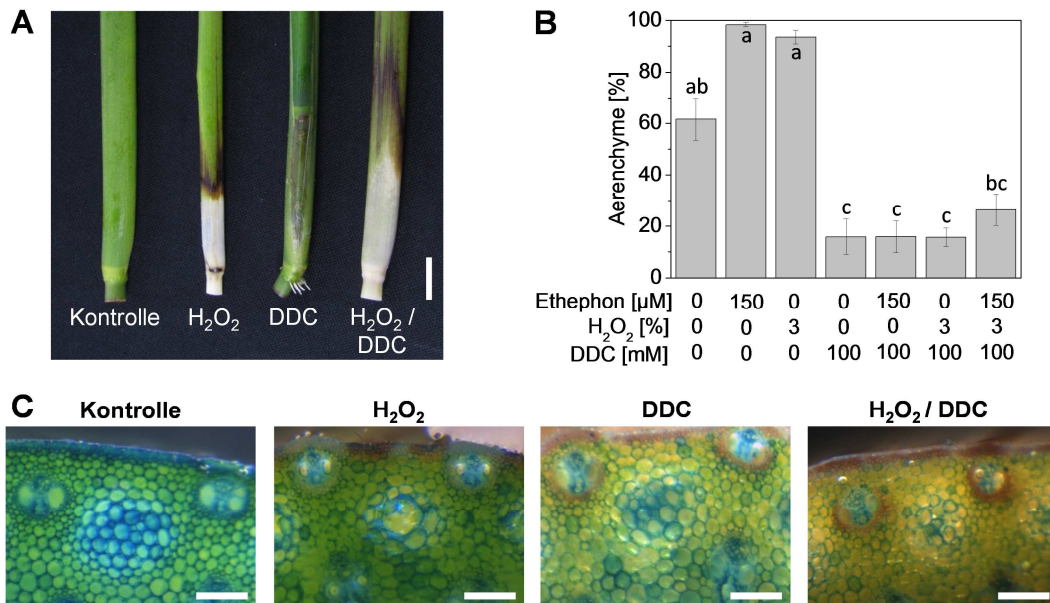


Abbildung 10: Superoxidanion-Radikal inhibiert die Aerenchymbildung. Dargestellt sind die Ergebnisse einer dreitägigen Inkubation von Stängelsegmenten des Kultivars PG56 mit 150 μ M Ethephon, 3% (v/v) H_2O_2 und 100 mM DDC in verschiedenen Kombinationen. **A** Fotos von Kontrollstängeln, mit H_2O_2 oder DDC oder mit H_2O_2 und DDC behandelten Stängeln. Der Größenmaßstab entspricht 1 cm. **B** Aerenchyme [%] des zweitjüngsten Internodiums 1 cm über dem dritten Knoten. Mittelwerte (\pm SE) aus Zählungen von 14 oder 15 Segmenten aus drei biologischen Replikaten. Es wurde eine ANOVA (Tukey-Test) durchgeführt ($P \leq 0,001$). Signifikant unterschiedliche Werte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. **C** Evans Blau-Färbung zur Visualisierung toter Zellen im Präaerenchym in Querschnitten von behandelten Stängeln. Der Größenmaßstab entspricht 200 μ m.

H_2O_2 fördert die Aerenchymbildung und $O_2^{\bullet-}$ inhibiert diese. Die Inhibierung der NADPH-Oxidase-vermittelten Synthese von $O_2^{\bullet-}$ führte zu einer Induktion der Aerenchymentwicklung. Das Verhältnis der beiden untersuchten ROS scheint für die Aerenchymbildung von Bedeutung zu

sein. Die Ethylen-induzierte Aerenchymentwicklung wird durch ROS vermittelt.

Die hypoxische Stressantwort von Tiefwasserreis ist von der Art der Überflutung abhängig

Überflutung führt in Reis zu hypoxischen Bedingungen und zu einer Akkumulation von Ethylen (Jackson 1985). Das Phytohormon induziert in Reis zum Beispiel Adventivwurzelwachstum (Lorbiecke und Sauter, 1999) und Aerenchymbildung in Internodien (Kapitel 1). Um die Sauerstoff- und Ethylen-Konzentrationen innerhalb der Pflanze und Überflutungs-induzierte Stressantworten wie Adventivwurzelwachstum und Aerenchymbildung detaillierter zu charakterisieren, wurden Pflanzen des Tiefwasserreis-Kultivars PG56 für drei Tage bei 16 Stunden Licht und acht Stunden Dunkelheit partiell oder komplett geflutet. Bei der partiellen Flutung befanden sich circa 20 bis 30 cm der Pflanze oberhalb der Wasseroberfläche. Darüber hinaus verblieb bei anderen partiell gefluteten Pflanzen das dritte beziehungsweise vierte Blatt unter Wasser. Kontrollpflanzen wurden bei gleichem Tag/Nacht-Rhythmus nicht geflutet. Proben wurden am Ende der letzten Dunkelphase genommen.

Es wurde der Sauerstoffgehalt in den Lakunen der ersten drei Internodien bestimmt (Abbildung 11A). In allen drei analysierten Internodien der Kontrollpflanzen wurde ein Sauerstoffgehalt von 21% gemessen. Durch alle Arten der Überflutung nahm im zweiten und dritten Internodium der O₂-Gehalt auf 10% bei totaler bis 13% bei partieller Überflutung ab. Im jüngsten Internodium waren bei partieller Flutung 17,6% O₂ und bei kompletter Flutung 11,7% O₂ vorhanden. Bei partieller Flutung mit dem dritten Blatt unter Wasser waren 14,0% O₂, mit dem vierten Blatt unter Wasser 15,3% O₂ in Lakunen des ersten Internodiums vorhanden.

Zusätzlich wurde die Ethylen-Konzentration in den Lakunen der jüngsten drei Internodien bestimmt (Abbildung 11B). In Kontrollen waren maximal 11 ppb Ethylen zu messen. Bei partieller Flutung war zwischen 28 ppb und 178 ppb Ethylen in den Lakunen vorhanden. Bei partieller Flutung mit

dem dritten Blatt unter der Wasseroberfläche wurden Ethylen-Konzentrationen von 317 ppb im ersten bis 681 ppb im dritten Internodium gemessen. Bei Flutung mit dem vierten Blatt unter Wasser wurden Ethylen-Konzentrationen von 116 ppb im ersten bis 360 ppb im dritten Internodium bestimmt. Bei kompletter Flutung war in allen Internodien die Ethylen-Konzentration mit 420 ppb im ersten, 615 ppb im zweiten und 1131 ppb im dritten Internodium am höchsten.

In den Lakunen der jüngsten Internodien nimmt die Sauerstoffkonzentration ab und die Ethylenkonzentration zu, je mehr die Reispflanze geflutet wurde und je tiefer die Internodien unter Wasser waren.

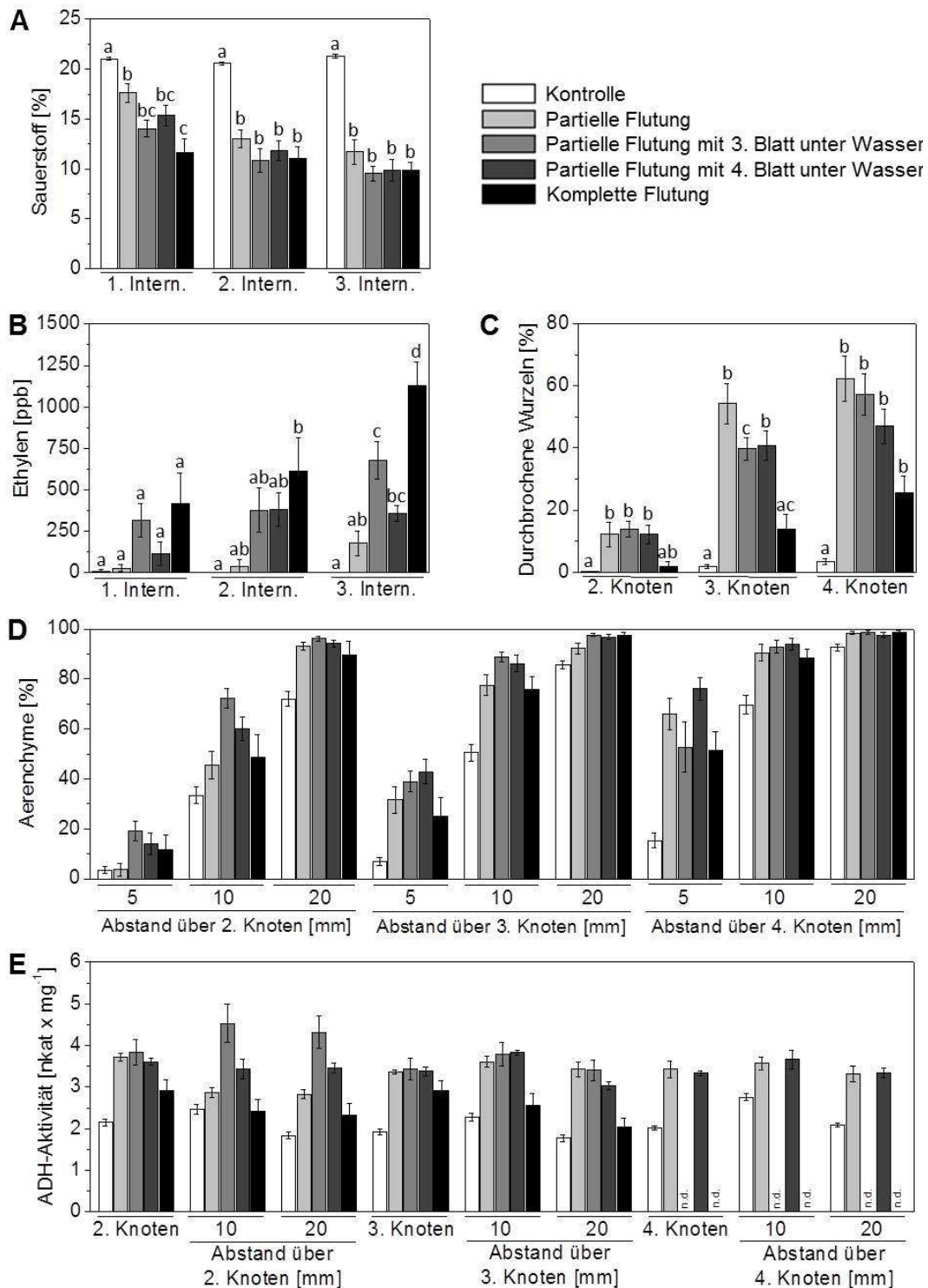


Abbildung 11: Charakterisierung der hypoxischen Stressantwort von Tiefwasserreis. Reispflanzen des Kultivars PG56 wurden für drei Tage bei 16 Stunden Licht und acht Stunden Dunkelheit partiell, partiell mit drittem oder vierstem Blatt unter Wasser oder komplett geflutet. Die Probenahme erfolgte jeweils am Ende der letzten Dunkelphase. Es wurden der Sauerstoff- (A) und der Ethylengehalt (B) in den ersten drei Internodien bestimmt. A Für den Sauerstoffgehalt [%] sind Mittelwerte (\pm SE) von zehn

bis 59 Stängeln aus drei bis neun biologischen Replikaten angegeben. **B** Mittelwerte (\pm SE) der Ethylengehalte [ppb] aus vier bis 24 Lakunen von zwei bis fünf biologischen Wiederholungen. **C** Die Anzahl der durchgebrochenen Adventivwurzeln wurde am 2., 3. und 4. Knoten bestimmt. Die Werte entsprechen Mittelwerten (\pm SE) von 19 bis 125 Knoten aus drei bis sieben Versuchen. **D** Die Aerenchyme [%] wurden in den ersten drei Internodien jeweils 5, 10 und 20 mm über dem basalen Knoten bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte (\pm SE) von Zählungen von 17 bis 103 Segmenten aus drei bis sieben Replikaten. **E** ADH-Aktivität wurde in den ersten drei Internodien jeweils in Abschnitten von 8 mm bis 12 mm und 18 mm bis 22 mm über dem und in dem basalen Knoten bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte (\pm SE) von sieben bis 42 Segmenten aus drei bis sechs biologischen Wiederholungen. n.d. = nicht detektiert. **A – C** Es wurde eine ANOVA (Tukey-Test, $P \leq 0,001$) durchgeführt. Signifikant unterschiedliche Werte in den einzelnen Internodien sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Als morphologische Anpassungsreaktionen an Überflutung wurden das Adventivwurzelwachstum und die Aerenchymbildung in Internodien analysiert. Es wurden am 2., 3. und 4. Knoten die Anzahl der durchgebrochenen Adventivwurzeln bestimmt (Abbildung 11C). Bei Kontrollen waren weniger als 4% der Wurzeln an allen analysierten Knoten durchgebrochen. Partiiell geflutete Pflanzen besaßen am 3. Knoten 54% und am 4. Knoten 62% durchgebrochene Adventivwurzeln. Bei kompletter Flutung waren 2% der Wurzeln am 2. Knoten und maximal 25% der Wurzeln am 4. Knoten durchgebrochen.

Zusätzlich wurde die Aerenchymbildung in den ersten drei Internodien 5, 10 und 20 mm über dem basalen Knoten analysiert (Abbildung 11D). Es zeigte sich, wie in Kapitel 1 beschrieben, ein Entwicklungs-abhängiger Gradient an gebildeten Aerenchymen im jeweiligen Internodium. Im ältesten analysierten Bereich der jeweiligen Internodien, 20 mm über dem basalen Knoten, waren konstitutiv die meisten Aerenchyme vorhanden. Überflutung induzierte die Aerenchymbildung. Die Aerenchymbildung war in partiell gefluteten Pflanzen mit einem Blatt unter Wasser am stärksten induziert.

Um die metabolische Anpassung von Reis an Überflutung zu charakterisieren, wurde in den ersten drei Internodien in den Bereichen

zwischen 8 mm und 12 mm, sowie zwischen 18 mm und 22 mm über und in dem basalen Knoten als Hypoxie-Indikator die Alkoholdehydrogenase-(ADH-)Aktivität bestimmt (Abbildung 11E). Die Grundaktivität der ADH in Kontrollpflanzen betrug in allen analysierten Internodien zwischen 1,8 und 2,8 nkat · mg⁻¹ Protein. Eine Zunahme der Aktivität konnte im zweiten und dritten Internodium in allen partiell gefluteten Pflanzen, unabhängig davon, ob ein weiteres Blatt unter Wasser fixiert war, detektiert werden. Die höchste ADH-Aktivität war im Gewebe der ersten beiden Internodien bei den partiell gefluteten Pflanzen mit dem dritten Blatt unter Wasser vorhanden. Die Aktivität lag zwischen 3,4 bis 4,5 nkat · mg⁻¹ Protein. Die geringsten Zunahmen wurden bei komplett gefluteten Pflanzen mit Aktivitäten zwischen 2,1 nkat · mg⁻¹ Protein im zweiten Internodium und 2,9 nkat · mg⁻¹ Protein im zweiten und dritten Knoten bestimmt.

Darüber hinaus wurde die ADH-Aktivität im dritten Blatt von partiell gefluteten Pflanzen bestimmt. Die Grundaktivität der ADH war im dritten Blatt mit 0,03 nkat · mg⁻¹ Protein (Abbildung 12) circa 100-fach geringer als in den Knoten oder Internodien (Abbildung 11E). Bei partieller Flutung stieg die Aktivität in den Blattteilen, die unter der Wasseroberfläche waren, statistisch signifikant an. Die ADH-Aktivität verzehnfachte sich auf 0,28 nkat · mg⁻¹ Protein. Bei den Blattteilen, die Kontakt zu atmosphärischen Sauerstoff hatten, blieb die ADH-Aktivität bei 0,05 nkat · mg⁻¹ Protein.

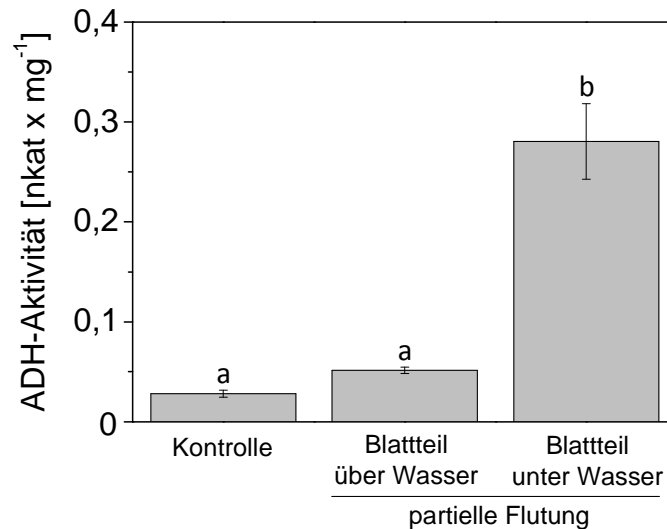


Abbildung 12: ADH-Aktivität ist in gefluteten Teilen des dritten Blattes erhöht.

Pflanzen des Kultivars PG56 wurden für drei Tage bei 16 Stunden Licht und acht Stunden Dunkelheit partiell geflutet. Die ADH-Aktivität wurde im dritten Blatt von nicht gefluteten Kontrollen und bei gefluteten Pflanzen von Blatteilen unter und über der Wasseroberfläche bestimmt. Mittelwerte (\pm SE) wurden von neun Messungen aus drei biologischen Replikaten gebildet. Es wurde eine ANOVA (Tukey-Test, $P \leq 0,001$) durchgeführt. Signifikant unterschiedliche Werte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den Internodien der Reispflanze hypoxische Bedingungen herrschen. Je nach Überflutungshöhe nahmen die Sauerstoffkonzentration ab und die Ethylenkonzentration zu. Hierbei wurde in den ersten drei Internodien jedoch nie eine Sauerstoffkonzentration von 10% unterschritten. Demzufolge traten in den jüngsten Internodien keine anoxischen Bedingungen auf. Das Phytohormon Ethylen akkumulierte am stärksten mit einer Konzentration von 1131 ppb im dritten Internodium bei totaler Überflutung der Pflanze. Als morphologische Anpassung der Reispflanze an Überflutung wachsen an den Knoten Ethylen-abhängig Adventivwurzeln aus (Lorbiecke und Sauter, 1999) und Aerenchyme werden in den Internodien ausgebildet (Kapitel 1). Interessanterweise wuchsen bei kompletter Flutung weniger Adventivwurzeln aus als bei partieller Überflutung, obwohl in dem darüber liegenden Internodium die

höchste Ethylen-Konzentration messbar war. Es scheint andere Faktoren zu geben, die das Adventivwurzelwachstum limitierten.

Die Aerenchymbildung wurde durch alle getesteten Überflutungen gefördert. Die meisten Aerenchyme wurden bei partieller Flutung mit zusätzlich einem Blatt unter Wasser gemessen. Auch die ADH-Aktivität war im ersten Internodium bei partieller Flutung mit dem dritten Blatt unter Wasser am höchsten. Bei totaler Flutung wurde die geringste Aktivitätszunahme gemessen. Die ADH-Aktivität ist gewebespezifisch und abhängig von der Überflutungsart. In Blättern lag eine 100-fach geringere Grundaktivität der ADH vor. Partielle Flutung des Blattes bewirkte eine Erhöhung der ADH-Aktivität in den gefluteten Teilen. Kontakt mit atmosphärischem Sauerstoff verhindert die Induktion der ADH in demselben Organ.

Ethylen induziert eine Porositätszunahme in Internodien und Knoten

Die Porosität eines Gewebes entspricht dem Verhältnis von Interzellularen und Aerenchymen zu dessen Gesamtvolumen (Visser und Bögemann, 2003). Mit Ausbildung von Aerenchymen und deren Vergrößern vom frühen zum späten Aerenchym sollte die Porosität in Internodien zunehmen. Zur Untersuchung inwieweit sich die Porosität durch Ethylen ändert, wurden Stängelsegmente des Kultivars PG56 für zwei Tage mit 150 μM Ethephon behandelt und die Porosität sowie die Aerenchyme 1, 2, 3 und 4 cm über dem dritten Knoten bestimmt (Tabelle 4). Eine Entwicklungs-abhängige Zunahme der Aerenchyme von 51,4% 1 cm über dem dritten Knoten auf 95,6% 4 cm über dem Knoten konnte im zweiten Internodium beobachtet werden. Zudem wurde eine Ethylen-induzierte Zunahme der Aerenchyme beobachtet. Die Porosität wurde mit der Auftriebs-basierten Methode nach Visser und Bögemann (2003) bestimmt. Die Porosität in den Kontrollen stieg Entwicklungs-abhängig von 3,0% 1 cm auf 5,8% 4 cm über dem dritten Knoten an. Ethephon induzierte eine Erhöhung der Porosität in den Reisinternodien auf bis zu 7,0%.

Tabelle 4: Ethylen induziert die Zunahme der Porosität im zweiten Internodium.

Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums des Kultivars PG56 wurden für zwei Tage mit 150 μM Ethephon behandelt. Die Aerenchyme und die Porosität wurden in der angegebenen Höhe über dem dritten Knoten bestimmt. Die Porosität wurde mit der Auftriebs-basierten Methode (Visser und Bögemann, 2003) analysiert. Die Daten sind Mittelwerte (\pm SE) aus drei oder vier Experimenten mit je 30 Reissegmenten. Der Stern kennzeichnet eine statistisch signifikante Erhöhung der Porosität bei den Ethephon-behandelten Segmenten gegenüber den Kontrollsegmenten (t-Test, $P \leq 0,05$).

Abstand über 3. Knoten [cm]	Kontrolle		150 μM Ethephon	
	Aerenchyme [%]	Porosität [%]	Aerenchyme [%]	Porosität [%]
1	51,4 (\pm 6,2)	3,0 (\pm 0,6)	89,7 (\pm 2,3)	4,3 (\pm 0,3)
2	85,3 (\pm 3,2)	5,1 (\pm 0,2)	97,1 (\pm 0,7)	5,6 (\pm 0,1)
3	92,5 (\pm 1,5)	5,5 (\pm 0,3)	97,8 (\pm 0,6)	7,0 (\pm 0,2) *
4	95,6 (\pm 1,0)	5,8 (\pm 0,5)	98,7 (\pm 0,5)	6,7 (\pm 0,4)

Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Knoten von Reis mit einem weißen Gewebe, dem Diaphragma, gefüllt waren (Kapitel 1). Zur weiteren Analyse wurden von Stängelsegmenten des zweitjüngsten Internodiums von Kultivar PG56 Längsschnitte durch den dritten Knoten angefertigt (Abbildung 13A). Aufnahmen vom Querschnitt unter dem Mikroskop zeigten, dass das Diaphragma mit vielen, großen Interzellularen durchzogen war (Abbildung 13B). Zur Visualisierung der Porosität wurde vor dem Längsschnitt durch den Knoten die Lakune des Internodiums vollständig mit einer Bromphenolblau-Lösung gefüllt. Die Färbelösung drang in das Diaphragma ein (Abbildung 13C). Nach Entfernung des umgebenden Blattes konnten Verbindungen vom Knoten zu den Aerenchyemen des Blattes, durch Austreten der Lösung, beobachtet werden (Abbildung 13D). Der Knoten der Reispflanze enthält ein poröses Diaphragma und es gibt wie von Arashi und Nitta (1955) beschrieben Verbindungen zwischen der Lakune und den Blattaerenchyemen.

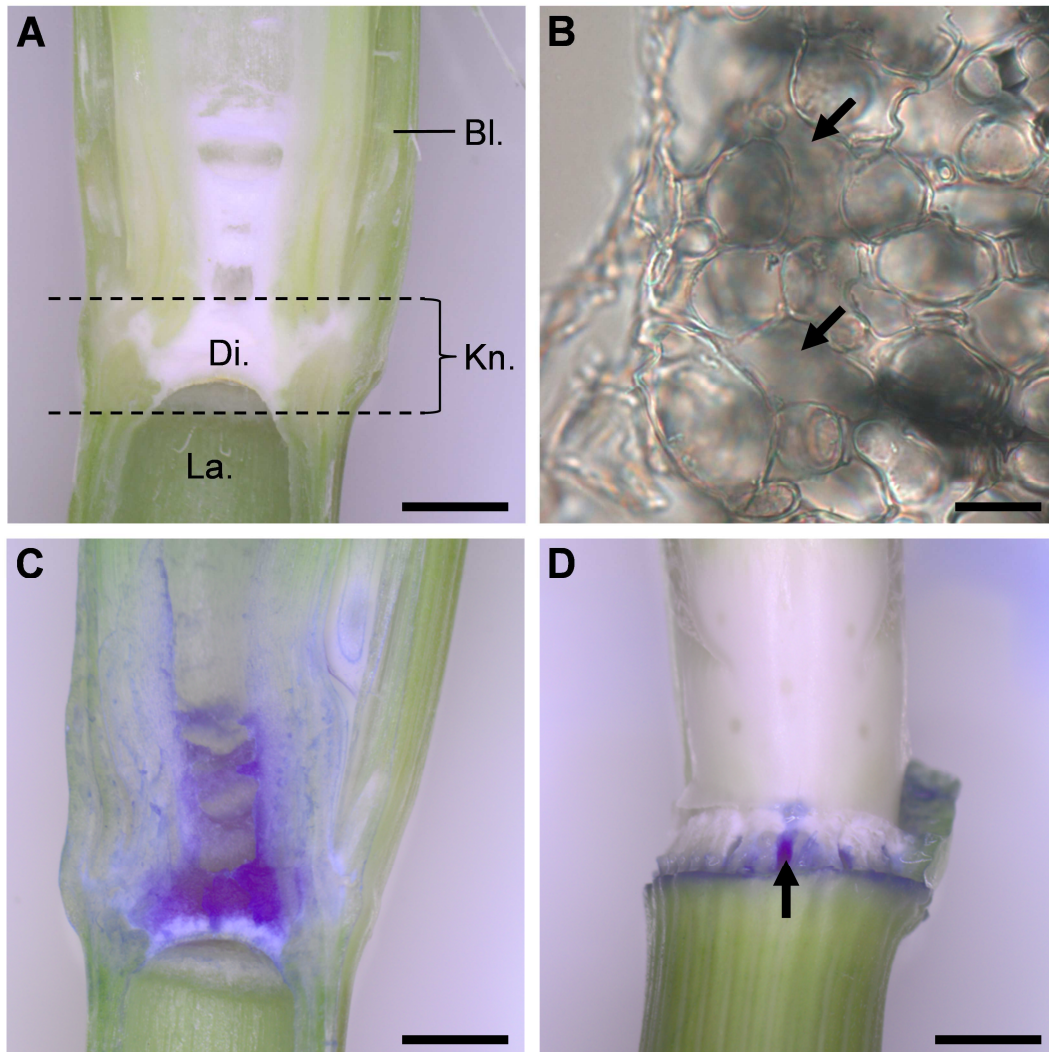


Abbildung 13: Visualisierung der Porosität von Reisknoten. Segmente des Kultivars PG56 des zweitjüngsten Internodiums wurden vollständig mit einer Bromphenolblau-Lösung gefüllt. Es wurde jeweils der dritte Knoten für die Untersuchungen genutzt und dabei jeweils vier bis sieben Knoten analysiert. **A** Längsschnitt eines ungefärbten Segmentes. Bl. = Blatt; Di. = Diaphragma; Kn. = Knoten; La. = Lakune. **B** Vergrößerte Aufnahme eines Querschnitts durch den apikalen Bereich des Knotens mit Zellen des Diaphragmas und Interzellularen (Pfeil). Der Maßstab entspricht 20 μm . **C** Längsschnitt durch einen gefärbten Stängel zeigt die Porosität des Diaphragmas durch Blaufärbung. **D** Dritter Knoten eines gefärbten Segments. Das umgebende Blatt wurde entfernt. Der Pfeil zeigt eine Verbindung vom Knoten in das Blattaerenchym. **A, C, D** Der Balken entspricht 2 mm.

Für die Untersuchung, ob Ethylen die Interzellularenbildung in den Knoten beeinflusst, wurde die Porosität im zweiten und dritten Knoten nach Behandlung mit 150 μM Ethephon bestimmt (Tabelle 5). Der dritte Knoten wies mit 10,7% eine höhere Porosität als der zweite Knoten mit 8,7% auf. Nach Behandlung mit Ethephon konnte eine Zunahme der Porosität auf 9,1% im zweiten und 11,5% im dritten Knoten gemessen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Ethylen eine signifikante Porositätszunahme in Internodien durch Aerenchymbildung induzieren kann. Eine Erhöhung der Porosität in den Knoten könnte zu einer verbesserten Diffusion von Gasen innerhalb der Pflanze führen. Im zweiten und dritten Knoten war eine geringe Porositätserhöhung messbar. Diese könnte durch verstärkte Bildung von Interzellularen im Diaphragma hervorgerufen worden sein.

Tabelle 5: Ethylen ändert die Porosität in den Reisknoten nicht signifikant. Die Porosität der basalen Knoten des ersten und zweitjüngsten Internodiums wurde mit der Auftriebs-basierten Methode (Visser und Bögemann, 2003) bestimmt. Dafür wurden Stängelsegmente der betreffenden Internodien des Kultivars PG56 für zwei Tage ohne oder mit 150 μM Ethephon behandelt. Angegeben sind die Mittelwerte (\pm SE) der Porosität aus drei Messungen mit je 30 Knoten. Die Porositätserhöhungen nach Ethephonbehandlung waren statistisch nicht signifikant (t-Test, $P \leq 0,05$).

Knoten	Porosität [%]	
	Kontrolle	150 μM Ethephon
2	8,7 (\pm 0,7)	9,1 (\pm 0,5)
3	10,7 (\pm 0,7)	11,5 (\pm 0,5)

Die Porosität der ersten vier Knoten wurde mit der Auftriebs-basierten Methode (Visser und Bögemann, 2003) an Pflanzen des Kultivars PG56, die für drei Tage partiell geflutet wurden, analysiert (Tabelle 6). Die Porosität nahm Entwicklungs-abhängig von 5,5% im ersten Knoten auf 9,5% im vierten Knoten zu. Je älter der Knoten desto höher die Porosität des Gewebes. Darüber hinaus nahm die Porosität in den ersten beiden Knoten nach Überflutung der Pflanzen zu. Im ersten Knoten stieg diese signifikant von 5,5% auf 8,3% und im zweiten Knoten von 7,5% auf 8,1%.

Beim dritten und vierten Knoten konnte keine Erhöhung der Porosität durch Überflutung gemessen werden. Die Porosität wurde in jüngeren Knoten durch Überflutung erhöht. Der Vergleich der Porositäten der Knoten mit der aus dem Ethephon-Experiment (Tabelle 5) zeigt eine Abweichung von 1,2% im zweiten und 1,8% im dritten Knoten. Die Abweichungen könnten durch Verletzungen bei der Herstellung der Stängelsegmente hervorgerufen worden sein. Durch Verletzung wird Ethylen vermehrt an den Schnittkanten gebildet (Yoo *et al.*, 2009). Dies könnte zu einer erhöhten Porosität in den Kontrollsegmenten geführt haben.

Tabelle 6: Zunahme der Porosität in Knoten nach partieller Flutung. Pflanzen des Kultivars PG56 wurden für drei Tage partiell geflutet. Die Porosität der ersten vier Knoten wurde mit der Auftriebs-basierten Methode (Visser und Bögemann, 2003) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte (\pm SE) von drei oder vier Experimenten mit je 20 bis 30 Knoten. Der Stern kennzeichnet eine statistisch signifikante Erhöhung der Porosität der gefluteten Knoten gegenüber den Kontrollen (t-Test, $P \leq 0,05$).

Knoten	Porosität [%]	
	Kontrolle	partiell geflutet
1	5,5 (\pm 0,4)	8,3 (\pm 0,2) *
2	7,5 (\pm 0,4)	8,1 (\pm 0,3)
3	8,9 (\pm 0,4)	8,5 (\pm 0,1)
4	9,5 (\pm 0,1)	9,5 (\pm 0,3)

Durch Querschnittsanalysen (Visser und Bögemann, 2003) kann ebenfalls die Porosität bestimmt werden. Die Porosität der ersten drei Internodien wurde durch Querschnittsanalysen bei partiell gefluteten Pflanzen bestimmt (Tabelle 7). Nach drei Tagen partieller Flutung wurden Querschnitte 1, 2, 3 und 4 cm über dem basalen Knoten hergestellt und die Flächen des Gesamtquerschnitts, des Gewebes, der Präaerenchyme und der Aerenchyme vermessen. Der Anteil der Aerenchymflächen an der Gesamt- und der Gewebefläche wurde berechnet. Die Gesamtfläche entspricht der Fläche, die das Gewebe und die Lakune einnehmen. Die Gewebefläche ist als die Fläche definiert, die das Gewebe in dem

Querschnitt einnimmt. Die Porosität nahm innerhalb der einzelnen Internodien Entwicklungs-abhängig von 0% bis 5,1% bezogen auf die Gewebefläche zu. Durch partielle Flutung wurde die Aerenchymbildung induziert und dadurch die Porosität auf 0,3% bis 5,9% je nach Alter des Gewebes erhöht.

Tabelle 7: Entwicklungs-abhängige und Überflutungs-induzierte Zunahme der Porosität in Reisinternodien. Pflanzen des Kultivars PG56 wurden für drei Tage partiell geflutet. Es wurden Querschnitte in den ersten drei Internodien 1, 2, 3 und 4 cm über dem basalen Knoten angefertigt und die Porosität mit der Querschnittsanalyse (Visser und Bögemann, 2003) berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anteile der Aerenchymflächen an der Gesamt- oder der Gewebefläche. Es wurden neun bis zwölf Stängelquerschnitte aus zwei biologischen Replikaten vermessen.

Internodium	Abstand über basalem Knoten [cm]	Porosität (Gesamtfläche) [%]		Porosität (Gewebefläche) [%]	
		Kontrolle	partiell geflutet	Kontrolle	partiell geflutet
1	1	0	0,2	0	0,3
	2	0,8	2,1	1,6	3,4
	3	1,8	3,1	3,8	5,4
	4	2,2	3,4	4,5	5,9
2	1	0,3	0,7	0,5	1,0
	2	1,8	2,3	3,7	3,7
	3	2,3	2,7	4,6	4,8
	4	2,5	2,7	5,1	4,7
3	1	0,3	1,2	0,5	1,8
	2	1,2	2,1	2,2	3,5
	3	1,9	2,7	3,3	4,8
	4	2,0	2,7	3,6	4,8

Die Porosität nimmt, wie die Aerenchymbildung, in Internodien Entwicklungs-abhängig zu. Auf das Gewebe bezogen nehmen Aerenchyme höchstens 5,9% der Fläche ein. Auf die Gesamtfläche bezogen sind das 3,4%. Die Lakune nimmt bis zu 50% des Stängelquerschnitts ein (Daten nicht gezeigt) und entspricht damit circa dem 15-fachen der Aerenchymflächen. Dadurch ist die Funktion der Aerenchyme unklar, da eine erleichterte Diffusion von Gasen innerhalb

der Pflanze durch die verhältnismäßig große Lakune gewährleistet sein könnte.

G-Proteine könnten in der Zelldifferenzierung im Präaerenchym involviert sein

G-Proteine spielen in Signalwegen von epidermalen und aerenchymalen Zelltodprozessen in Mais und Reis eine Rolle (He *et al.*, 1996b; Steffens und Sauter, 2009b). Für die Untersuchung, ob die $G\alpha$ -Untereinheit D1 heterotrimerer G-Proteine an der Überflutungs-induzierten Aerenchymbildung beteiligt ist, wurden Pflanzen des Wildtyps und von *d1* des Kultivars Nipponbare für sieben Tage partiell geflutet. Es wurden in den jüngsten beiden Internodien im Abstand von 3, 10 und 20 mm über dem basalen Knoten die Zellen des Präaerenchyms betrachtet und die Aerenchyme gezählt. Die Präaerenchymfelder in Wildtyp-Pflanzen besitzen große Interzellularen (Abbildung 14A), die in *d1*-Pflanzen fehlten (Abbildung 14B). Im Wildtyp waren zwischen 25 bis 29 Präaerenchym- oder Aerenchymfelder vorhanden (Abbildung 14C). Pflanzen von *d1* besaßen zwischen 13 und 25 Präaerenchym- oder Aerenchymfelder. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Aerenchyme berechnet. Wildtyp- und *d1*-Pflanzen besaßen nach partieller Flutung über 90% Aerenchyme in den analysierten Internodien (Abbildung 14D). Nur 3 mm über dem zweiten Knoten war die Aerenchymbildung in *d1*-Pflanzen mit 69% geringer als im Wildtyp mit 94% Aerenchymen.

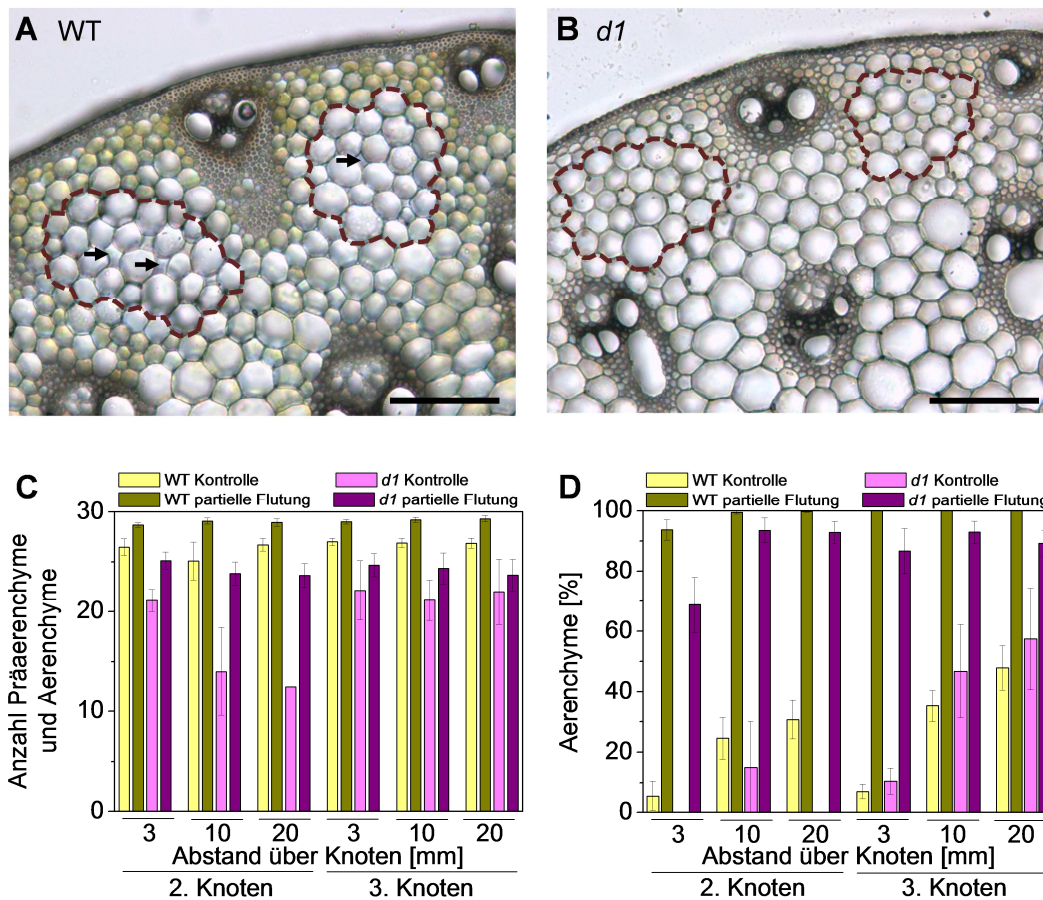


Abbildung 14: Die Überflutungs-induzierte Aerenchymbildung ist nicht durch $G\alpha$ vermittelt. Wildtyp- und *d1*-Pflanzen des Kultivars Nipponbare wurden für sieben Tage partiell geflutet. Dabei verblieben ca. 20 bis 30 cm der Pflanzen über der Wasseroberfläche. Querschnitte durch das erste Internodium 20 mm über dem zweiten Knoten der ungefluteten Kontrollpflanzen (A) des Wildtyps und (B) von *d1*. Präaerenchyme in A + B wurden hervorgehoben (rote, gestrichelte Linie) und Interzellularen in A mit einem Pfeil markiert. Größenmaßstab entspricht 100 μ m. C Aerenchyme und Präaerenchyme wurden in den ersten beiden Internodien 3, 10 und 20 mm über dem basalen Knoten gezählt. D Aerenchyme [%] wurden berechnet. Die Werte sind Mittelwerte (\pm SE) von zwei bis 21 Stängeln aus ein bis drei biologischen Replikaten.

Die Analysen zeigen, dass die $G\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine an der Entwicklung der Präaerenchymzellen beteiligt sein könnte. Der Überflutungs-induzierte Zelltod der Präaerenchymzellen scheint nicht von der Signaltransduktion durch die $G\alpha$ -Untereinheit abhängig zu sein.

Degradierte DNA ist in Präaerenchymzellen nachweisbar

Während der lysigenen Aerenchymbildung in den Internodien sterben die Präaerenchymzellen ab, so dass ein gasgefüllter Raum gebildet wird (De Bary, 1884). Die zellulären Ereignisse während des programmierten Zelltods in Pflanzen sind spezies- und gewebespezifisch.

Beim programmierten Zelltod wird häufig die DNA im Zellkern abgebaut. DNA-Degradierung kann zum Beispiel beim Entwicklungs-abhängigen Zelltod in Blättern von *Aponogeton madagascariensis* (Gunawardena *et al.*, 2004; Lord *et al.*, 2011) und bei der Aerenchymbildung in Maiswurzeln (Gunawardena *et al.*, 2001) beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob beim Ethylen-induzierten Zelltod, der zur Aerenchymbildung in Reisinternodien führt, DNA-Degradierung auftritt, wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums für zwei, vier, acht, 24 und 48 Stunden mit 150 µM Ethephon behandelt. Anschließend wurde DNA aus Internodiumbereichen 9 mm bis 11 mm über dem dritten Knoten isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt. Bei allen Proben war eine Bande oberhalb von 10000 bp zu erkennen (Abbildung 15A). Diese beinhaltet die unverdaute genomische DNA. Weder in den mit Ethephon behandelten Proben noch in der Kontrolle wurden andere Banden oder ein deutlicher Schmier, der auf degradierte DNA hinweist, nachgewiesen.

Circa 5% der Zellen in Internodien sind Präaerenchymzellen und können Ethylen-induzierten programmierten Zelltod durchlaufen. Aufgrund der geringen Anzahl an sterbenden Zellen kann es sein, dass mit dieser Methode keine mögliche DNA-Degradierung in Internodien nachgewiesen werden kann.

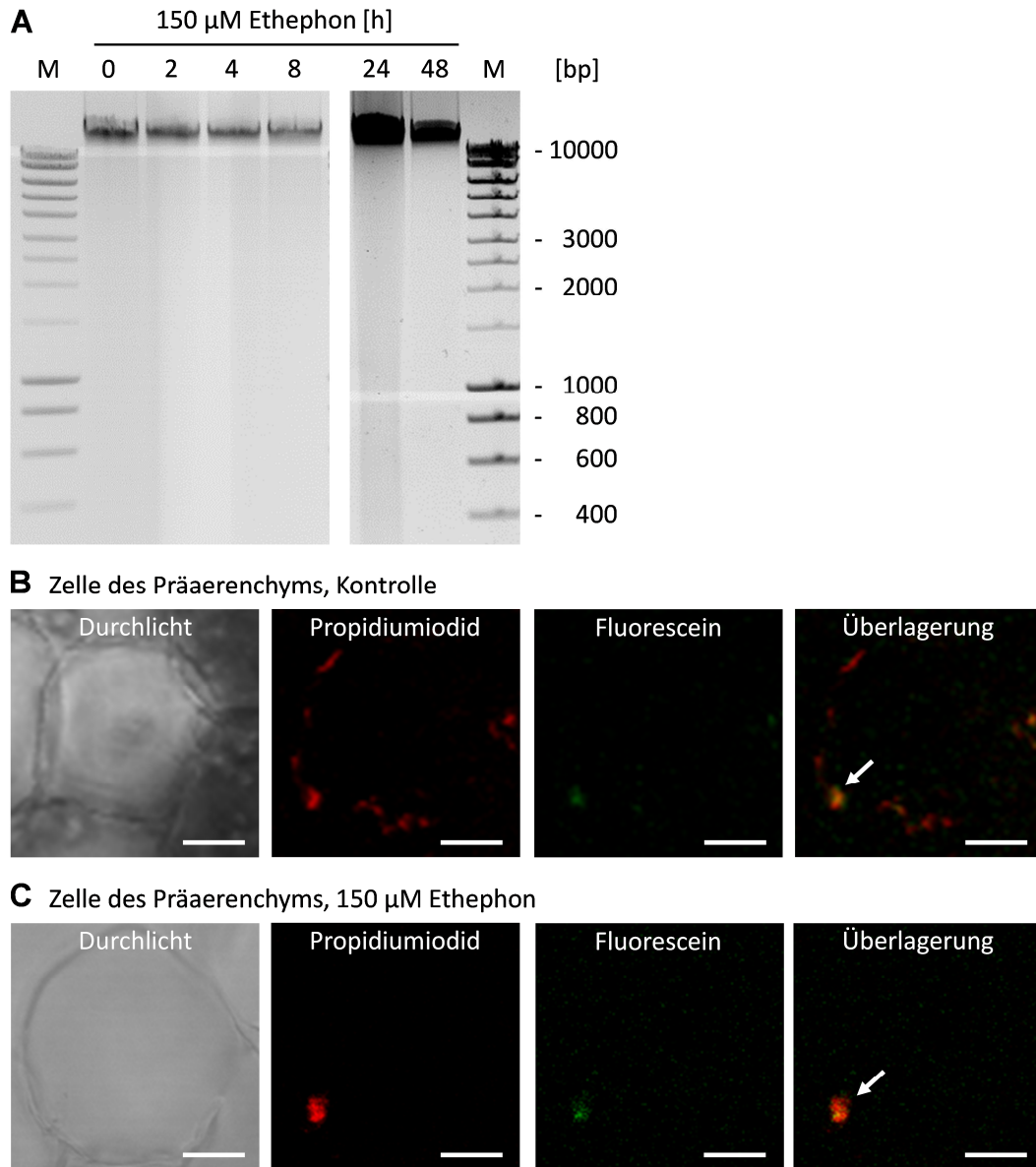


Abbildung 15: Nachweis degradiertes DNA in Präaerenchymzellen. Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums des Kultivars PG56 wurden für zwei, vier, acht, 24 und 48 Stunden (**A**) beziehungsweise 24 Stunden (**B-C**) ohne und mit 150 μ M Ethephon behandelt. **A** Es wurde aus Bereichen zwischen 9 mm bis 11 mm über dem dritten Knoten DNA isoliert und elektrophoretisch getrennt. M = Marker (400 bp bis 10000 bp). **B-C** In Querschnitten 1 cm über dem dritten Knoten wurde degradierte DNA in Zellkernen mit der TUNEL-Methode in Präaerenchymzellen der Kontrollen (**B**) und der behandelten Stängel (**C**) mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop nachgewiesen. Abgebildet sind Durchlichtbilder, Bilder der Zellkernfärbung mit Propidiumiodid (Anregung: 535 nm; Emission: > 620 nm), Bilder der Färbung der freien DNA-Enden konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (Anregung: 485 nm; Emission: 520 \pm 20 nm) und die Überlagerung der Bilder der Propidiumiodid- und Fluorescein-Fluoreszenz. Die Pfeile kennzeichnen Zellkerne mit degradiertes DNA. Es wurden je neun bis zwölf

Präaerenchyme aus zwei biologischen Replikaten analysiert. Der Balken entspricht 10 μm .

Zur spezifischen Analyse des DNA-Abbaus in Zellen des Präaerenchyms wurde die *TdT-mediated dUTP nick-end labeling*-Methode (TUNEL-Methode) durchgeführt. Hierfür wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums für 24 Stunden in An- oder Abwesenheit von 150 μM Ethephon behandelt und Querschnitte 1 cm über dem dritten Knoten verwendet. Degradierte DNA in Zellkernen der Präaerenchymzellen konnte mit der sensitiven TUNEL-Methode in Kontrollen (Abbildung 15B) und in behandelten Segmenten (Abbildung 15C) nachgewiesen werden.

Der DNA-Abbau konnte in den Präaerenchymenten während der Entwicklungs- und Ethylen-abhängigen Aerenchymbildung in einzelnen Zellen visualisiert werden. Eine gleichzeitige DNA-Degradierung in allen Präaerenchymzellen scheint nicht aufzutreten.

Die Beweglichkeit der Mitochondrien ist während des Ethylen-induzierten Zelltods in Präaerenchymzellen unverändert

Während des Entwicklungs-abhängigen Zelltods in den Blättern von *Aponogeton madagascariensis* nimmt die Mobilität der Mitochondrien in den sterbenden Zellen ab (Lord *et al.*, 2011). Dies kann als ein Charakteristikum des Zelltodprozesses angesehen werden.

Um die Bewegung der Mitochondrien in Präaerenchymzellen und umliegenden Parenchymzellen zu untersuchen, wurden Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums für 24 Stunden ohne und mit 150 μM Ethephon behandelt und Querschnitte 1 cm über dem dritten Knoten für die Analyse herangezogen (Abbildung 16A). Die Mitochondrien in Präaerenchymenten und dem umgebenen Parenchym wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff MitoTracker Red CMXRos angefärbt und sichtbar gemacht. Es wurde im Abstand von zwei Minuten ein Bild derselben Zelle aufgenommen und die Bilder überlagert. Durch die Überlagerung konnte

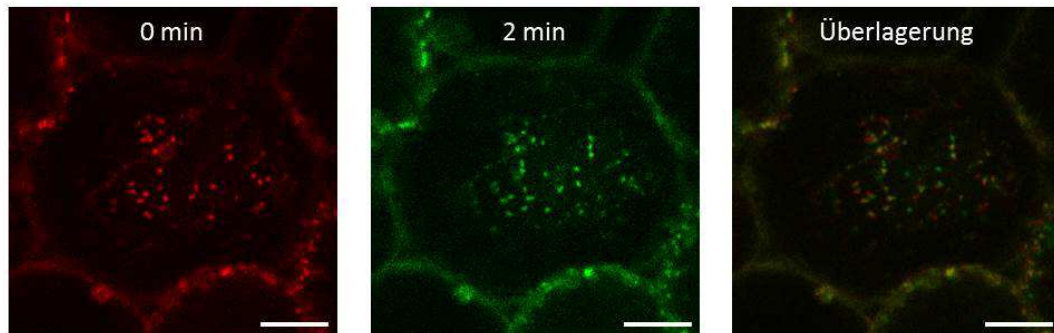
die Bewegung der Mitochondrien nach zwei Minuten analysiert und der Anteil sich bewegender Mitochondrien pro Zelle in Prozent berechnet werden (Abbildung 16B). Das Präaerenchym wurde für eine detailliertere Auswertung in zwei Bereiche unterteilt. Die Zellen der äußeren Zellreihe umfasste solche, die vom Mittelpunkt des Präaerenchyms am weitesten entfernt und an das Parenchym angrenzend lagen. Die Zellen, die im Inneren des Präaerenchyms lagen und von der äußeren Reihe gegen die Parenchymzellen abgegrenzt wurden umfassten den zweiten Bereich. Wenn sich ein Aerenchym im frühen Stadium ausbildet durchlaufen die inneren Zellen zuerst den Zelltodprozess (Kapitel 1).

In Zellen des Parenchyms bewegten sich konstitutiv 78% der Mitochondrien (Abbildung 16B). Nach eintägiger Inkubation der Stängelsegmente ohne oder mit Ethephon bewegten sich 58% beziehungsweise 56% der Mitochondrien. In der äußeren Zellreihe der Präaerenchyme bewegten sich konstitutiv 70% der Mitochondrien und nach einem Tag wurden 57% bewegte Mitochondrien in den unbehandelten und behandelten Stängelsegmenten bestimmt. Unabhängig von der Behandlung bewegten sich in den im Inneren liegenden Zellen der Präaerenchyme zwischen 60% bis 62% der Mitochondrien. Die Abnahme der Mitochondrien-Mobilität nach einem Tag in den unbehandelten und behandelten Stängelsegmenten und zwischen dem Parenchym und dem Präaerenchym war statistisch nicht signifikant. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Mitochondrien-Beweglichkeit in den Parenchymzellen und in den Zellen des Präaerenchyms. Die eintägige Behandlung der Stängelsegmente mit Ethephon hatte keinen Einfluss auf die Mobilität.

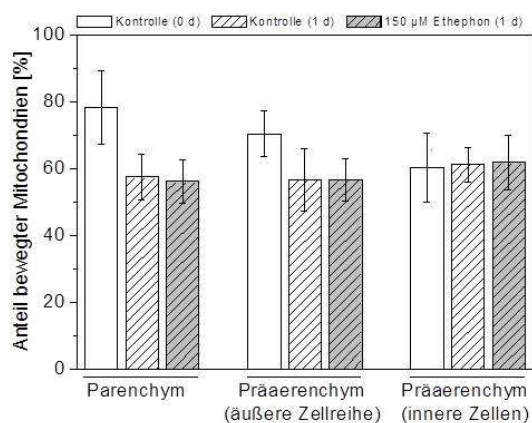
Die Aerenchymbildung in Präaerenchymfeldern der Internodien verläuft von Innen nach Außen und Ethylen induziert diesen Zelltodprozess (Kapitel 1). Da keine signifikanten Änderungen der Mitochondrien-Mobilität bei den Zellen des Präaerenchyms im Vergleich zu den Zellen des Parenchyms auftraten und auch Ethylen nach 24 Stunden keinen Einfluss auf die Beweglichkeit hatte, ist anzunehmen, dass während der

Aerenchymbildung die Mitochondrien-Beweglichkeit in den sterbenden Zellen nicht eingeschränkt ist.

A Zelle am äußeren Rand des Präaerenchyms, 150 μ M Ethephon



B



C

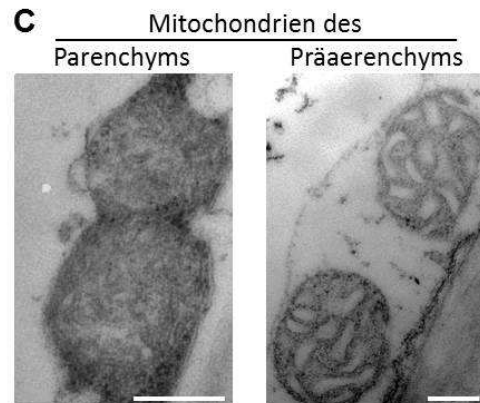


Abbildung 16: Mitochondrien des Präaerenchyms besitzen vergrößerte Cristae. A-B Querschnitte 1 cm über dem dritten Knoten wurden mit MitoTracker Red CMXRos gefärbt. Die Stängelsegmente des zweitjüngsten Internodiums des Kultivars PG56 wurden vorher für 24 Stunden ohne oder mit 150 μ M Ethephon inkubiert. **A** Beispiel einer zweiminütigen zeitversetzten Aufnahme der MitoTracker-Fluoreszenz (Anregung: 543 nm; Emission: 570 nm bis 610 nm) und einer Überlagerung der beiden Bilder einer Zelle der äußeren Zellreihe des Präaerenchyms nach eintägiger Ethylenbehandlung. Der Balken entspricht 10 μ m. **B** Mittelwerte (\pm SE) sich bewegender Mitochondrien [%] von fünf bis zehn Zellen aus zwei bis drei biologischen Wiederholungen. Es wurde eine ANOVA (Tukey-Test, $P \leq 0,001$) durchgeführt. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Ein t-Test ($P \leq 0,001$) zeigte keine statistischen Unterschiede der Bewegung der Mitochondrien der Parenchymzellen und der Mitochondrien der Präaerenchymzellen am Tag 0. **C** TEM-Aufnahmen von Mitochondrien des Parenchyms und des Präaerenchyms aus Stängelquerschnitten des Kultivars PG56 1 cm über dem

dritten Knoten. Im Präaerenchym war die Cristae erweitert und die Matrix kondensiert. Der Balken entspricht 300 nm.

Mitochondrien in Präaerenchymzellen besitzen vergrößerte Cristae

Bei dem durch den pflanzlichen Sekundärmetaboliten Chalkon induzierten Zelltod in *Arabidopsis*-Wurzeln (Díaz-Tielas *et al.*, 2012) und dem Entwicklungs-abhängigen Zelltod in den Blättern von *A. madagascariensis* (Lord *et al.*, 2011) wurden Veränderungen in der Ultrastruktur der Mitochondrien beobachtet. Die mitochondriale Matrix war kondensiert und die Cristae erweitert. Ob dies auch bei der Aerenchymbildung in Internodien beobachtet werden kann wurde mikroskopisch untersucht.

Für die Untersuchung der Ultrastruktur der Mitochondrien in Reisinternodien wurden Mitochondrien in Ultradünnschnitte 1 cm über dem dritten Knoten mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht (Abbildung 16C). Zweiundzwanzig Mitochondrien der Parenchym- und der Präaerenchymzellen wurden betrachtet. 85% der Mitochondrien des Parenchyms besaßen eine homogene Struktur. 15% der Mitochondrien des Parenchyms und 89% des Präaerenchyms wiesen eine kondensierte Matrix und vergrößerte Cristae auf. Das weist auf einen konstitutiven Verlust der Mitochondrienfunktion und dem Abbau der Mitochondrien in den Präaerenchymzellen hin. Signalmoleküle, wie zum Beispiel das Cytochrom c, können durch Veränderungen der Ultrastruktur ins Cytosol gelangen (Yao *et al.*, 2004; Díaz-Tielas *et al.*, 2012).

Mitochondrien in Präaerenchymzellen bilden Cluster

Während des Hitze-induzierten Zelltods von Reisprotoplasten aus Kallusgewebe nimmt das mitochondriale Membranpotential in den Zellen ab (Qi *et al.*, 2011). Bei dem Chalkon-induzierten Zelltod in *Arabidopsis*-Wurzeln konnte ebenfalls eine Depolarisation des Transmembranpotentials der Mitochondrien beobachtet werden (Díaz-Tielas *et al.*, 2012).

Für die Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials in Zellen des Reisinternodiums 1 cm über dem dritten Knoten wurde der Fluoreszenz-Farbstoff 5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyaniniodid (JC-1) genutzt. Bei stark negativem Membranpotential aggregieren die JC-1-Moleküle und emittieren eine rote Fluoreszenz. Bei einem depolarisierten Potential liegen die Farbstoffmoleküle als Monomere vor und emittieren eine grüne Fluoreszenz. Konstitutiv wurden in Parenchym- und Präaerenchymzellen Mitochondrien mit roter und grüner Fluoreszenz detektiert (Abbildung 17A). Eine gelbe Fluoreszenz resultiert aus der Depolarisierung des Transmembranpotentials. Die Mitochondrien lagen in Parenchym- und Präaerenchymzellen entweder einzeln oder in Clustern vor (Abbildung 17A). Es konnten in Präaerenchymzellen zusätzlich größere ca. zwei bis drei Mikrometer große Mitochondrien visualisiert werden, die rote und grüne Fluoreszenz aufwiesen. Für die Auswertung wurden vier Kategorien unterschieden. Die Zellen wurden nach dem mitochondrialen Membranpotential der Mehrheit der Mitochondrien in diesen Zellen unterschieden. Daraus ergaben sich Zellen, in denen die Mitochondrien überwiegend ein polarisiertes oder depolarisiertes Membranpotential aufwiesen, oder eine gleichverteilte Mischung aus beiden. Dazu gab es Zellen, in denen das Membranpotential der Mitochondrien im Prozess der Depolarisierung war (Abbildung 17B). 50% der Parenchymzellen wiesen eine überwiegend rote Fluoreszenz auf. In diesen Zellen besaßen die Mitochondrien ein polarisiertes Membranpotential. Im Inneren der Präaerenchyme besaßen 22% der Zellen Mitochondrien mit einem negativen Transmembranpotential. Eine überwiegend gelbe Fluoreszenz, und damit eine Depolarisation des mitochondrialen Potentials, wurde ausschließlich in Präaerenchymzellen detektiert. Eine gleichverteilte Mischung von Mitochondrien mit polarisiertem und depolarisiertem Membranpotential konnte bei 39% der inneren Präaerenchymzellen und bei 24% der Parenchymzellen beobachtet werden. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der mitochondrialen

Membranpotential-Verteilung zwischen den Parenchym- und den Präaerenchymzellen detektiert werden.

Zusätzlich wurde unterschieden, ob Mitochondrien in den Zellen einzeln oder in Clustern aggregiert vorlagen. Im Parenchym gab es in 43% der Zellen, in der äußeren Zellreihe der Präaerenchyme in 69% der Zellen und bei den inneren Zellen in 91% der Zellen aggregierte Mitochondrien (Abbildung 17B).

Es gibt keine signifikanten Unterschiede im Membranpotential der Mitochondrien von Zellen des Parenchyms und Präaerenchyms. Die inneren Präaerenchymzellen beinhalten statistisch signifikant erhöht mehr aggregierte Mitochondrien. Da der Zelltodprozess im Inneren der Präaerenchyme beginnt und sich von dort radial ausbreitet, scheint die Aggregation der Mitochondrien ein zelluläres Charakteristikum des aerenchymalen Zelltods zu sein.

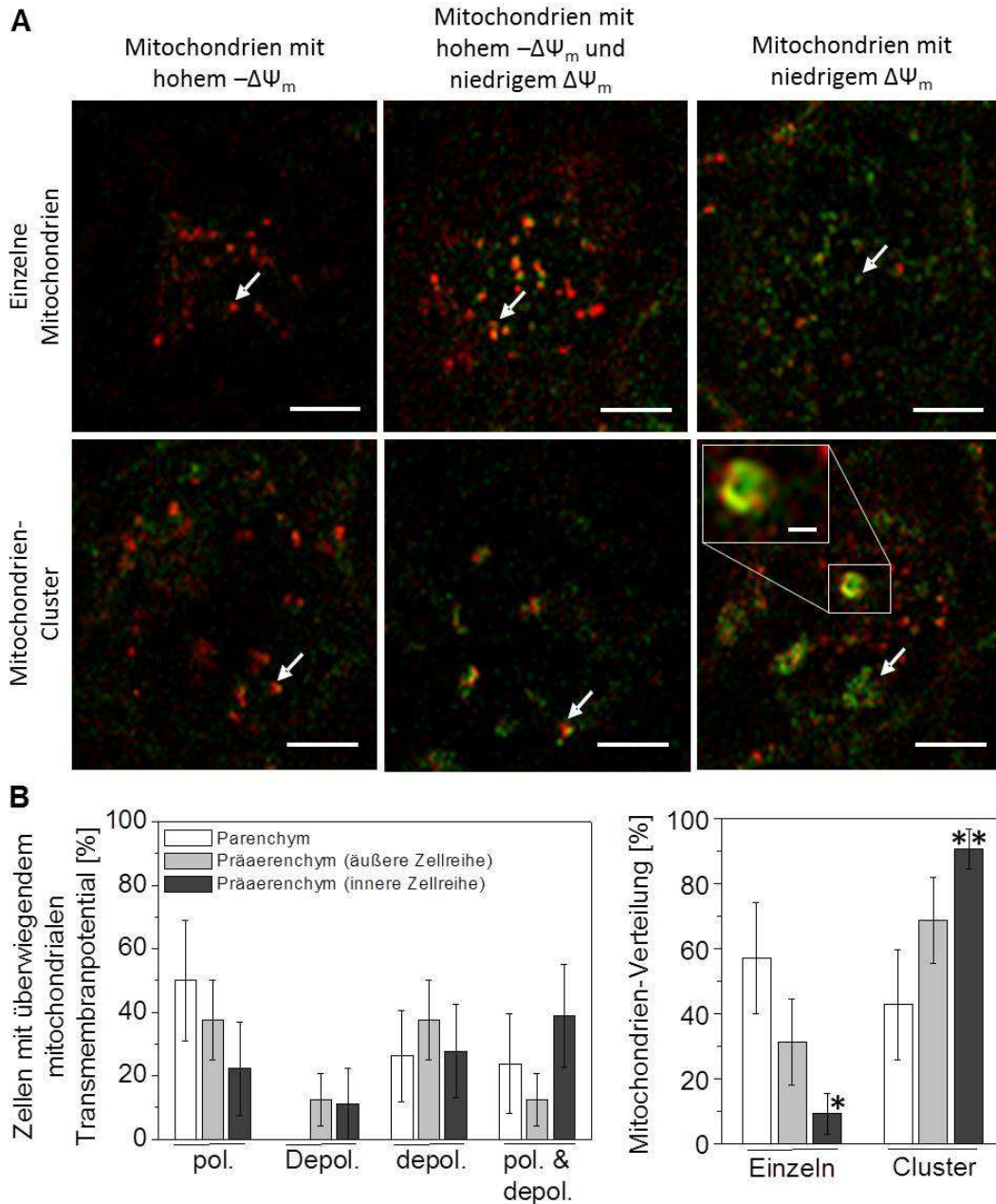


Abbildung 17: Mitochondrien im Präaerenchym bilden Cluster. Es wurden Querschnitte 1 cm über dem dritten Knoten des Kultivars PG56 mit JC-1 gefärbt. **A** Rote Fluoreszenz zeigt ein stark negatives Membranpotential ($\Delta\Psi_m$), grüne Fluoreszenz ein depolarisiertes Membranpotential und gelbe Fluoreszenz entsteht durch Überlagerung des roten und grünen Signals und zeigt eine Depolarisation des Membranpotentials an. Es wurden Zellen mit einzelnen und aggregierten Mitochondrien dargestellt. Die Vergrößerung zeigt ein großes Mitochondrium. Der Balken in der Vergrößerung entspricht 2 μm und sonst 10 μm . **B** Mittelwerte (\pm SE) des prozentualen Anteils von Zellen, eingeteilt nach den überwiegenden Membranpotentialen der Mitochondrien. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA, Tukey-Test, $P \leq 0,001$).

C Mittelwerte (\pm SE) des prozentualen Anteils von Zellen mit einzelnen oder aggregierten Mitochondrien. Die mit Stern gekennzeichneten inneren Zellen der Präaerenchyme besitzen statistisch signifikant mehr Cluster als einzelne Mitochondrien (t-Test, $P \leq 0,001$). **B-C** Die Werte stammen aus je sieben bis neun Parenchym- und Präaerenchymzellen von sechs verschiedenen Stängeln aus zwei biologischen Replikaten.

Zytologische Untersuchungen zeigten, dass die DNA in den Zellkernen der Präaerenchymzellen während des Zelltodprozesses degradiert. Des Weiteren ist die mitochondriale Ultrastruktur konstitutiv verändert. Die Matrix kondensiert und die Cristae sind vergrößert. Die Aerenchymbildung beginnt bei den inneren Zellen des Präaerenchyms und breitet sich in radialer Richtung aus. Bei den inneren Zellen aggregieren vermehrt die Mitochondrien, was auf einen Abbau der Mitochondrien hindeutet.

Abschließende Diskussion und Ausblick

Lysigene Aerenchymbildung in Reisinternodien ermöglicht eine erleichterte Sauerstoffdiffusion und verringert die Zellzahl

Überflutung kann zu hypoxischen Bedingungen in der Reispflanze führen. Im Tiefwasserreis-Kultivar PG56 sank die Sauerstoffkonzentration in den Lakunen der Internodien bei totaler und partieller Flutung am Ende der Dunkelphase nach drei Tagen im zweiten und dritten Internodium auf 10% bis 13% ab. Nur in dem jüngsten Internodium ist der Sauerstoffanteil von der Art der Überflutung abhängig. Bei kompletter Flutung beträgt die Sauerstoffkonzentration 11,7%. Partielle Flutung und damit eine Verbindung zu atmosphärischen Sauerstoff führt zu einer Abnahme der Konzentration auf 17,6%. Bei partieller Überflutung liegen hypoxische Bedingungen mit unter 13% Sauerstoff in dem zweiten und dritten Internodium in der Pflanze vor. Auch im Tiefwasserreis-Kultivar Habiganj Aman II wurden bei partieller Flutung in den Lakunen der jüngsten Internodien Sauerstoffkonzentrationen zwischen 2% und 18% abhängig vom Tag-/Nacht-Rhythmus gemessen (Stünzi und Kende, 1989). Eine ausreichende Sauerstoffversorgung gefluteter Organe über das Vorhandensein und die zusätzliche Bildung von Aerenchymen für die verbesserte Gasdiffusion können überlebenswichtig sein.

Erleichterte Sauerstoffverfügbarkeit wird unter anderem durch einen Gasfilm auf den Reisblättern ermöglicht (Raskin und Kende, 1985; Pedersen *et al.*, 2009). Diese externe Verbindung der Atmosphäre mit den gefluteten Organen erhöht die Wasser-Gas-Phasengrenze und die Gasdiffusion. Eine Konnektivität wird in der Pflanze über Durchlüftungsgewebe, den Aerenchymen, erreicht. Diese gasgefüllten Räume vermitteln einen erleichterten Gasaustausch über weite Strecken innerhalb der Pflanze. Aerenchyme werden konstitutiv in Reis in Wurzeln (Webb und Armstrong, 1983; Kawai *et al.*, 1998; Colmer, 2003), Blättern (Parlanti *et al.*, 2011) und Internodien (Arashi und Nitta, 1955; Kapitel 1) angelegt und zusätzlich wird eine vermehrte Bildung durch Überflutung gefördert.

Die Aerenchyme im Stängel wurden im Tiefwasserreis-Kultivar PG56 und dem Flachlandreis-Kultivaren Nipponbare und Kinmaze zwischen den Leitbündeln, drei bis fünf Zellreihen von der Epidermis entfernt, gebildet (Kapitel 1). Präaerenchymfelder bestehen im Internodienquerschnitt aus circa 15 bis 25 Zellen. Die Lokalisation zwischen den Leitbündeln definiert die Anzahl an Aerenchymen und Präaerenchymen in dem Reisstängel und ist zwischen den untersuchten Ökotypen identisch. Zusammen genommen nehmen die Präaerenchyme und Aerenchyme eine Fläche von bis zu 3,5% des Internodienquerschnitts ein, die Lakune hingegen bis zu 50%. Die Lakune könnte, aufgrund der Größe, für die erleichterte Gasdiffusion innerhalb der Pflanze ausreichend sein. Durch die Lokalisation der Aerenchyme zwischen den Leitbündeln könnte die Sauerstoffverfügbarkeit zum umliegenden Gewebe und damit zum Leitgewebe erhöht sein. Leitbündel benötigen für den Transport photosynthetisch gebildeter Assimilate Energie, die aus der Respiration in den Mitochondrien gewonnen wird. Während der Überflutung muss der Transport der Assimilate in die basalen Teile der Pflanze gewährleistet sein. Daher könnten die Aerenchyme bei Überflutung für die Aufrechterhaltung der Funktion der Leitbündel von essentieller Bedeutung sein.

Der Tiefwasserreis-Kultivar besaß konstitutiv mehr geformte Aerenchyme verglichen mit den Flachlandreis-Kultivaren. Die vermehrte Bildung von Durchlüftungsgewebe könnte eine Anpassungsreaktion sein. Die Kultivare dieser Ökotypen besitzen generell verschiedene adaptive Anpassungen an Überflutung (Bailey-Serres und Voeselek, 2008; Voeselek und Bailey-Serres, 2009). Bei toleranten Flachlandreis-Kultivaren ist das Wachstum während der Überflutung inhibiert und der Stoffwechsel herunterreguliert. Diese Kultivare können mehrere Wochen komplette Flutung überdauern und den Verbrauch an ATP und Kohlenhydraten reduzieren. Tiefwasserreis-Kultivare und intolerante Flachlandreis-Kultivare sind Überflutungs-intolerant. In diesen Kultivaren ist ein verstärktes Streckungswachstum des jüngsten Internodiums zu beobachten, um der

Sauerstofflimitierung zu entkommen. Diese Anpassung wird *low-oxygen escape syndrome* (LOES) genannt (Bailey-Serres und Voesenek, 2008; Voesenek und Bailey-Serres, 2009). Bei einem schnell steigenden Wasserspiegel sind in Tiefwasserreis mehr Aerenchyme konstitutiv ausgebildet. Dies ist vorteilhaft für die Gaszirkulation. Dadurch ist die erleichterte Gasdiffusion nur von der Konnektivität zur Atmosphäre, also der Elongation des jüngsten Internodiums, abhängig.

Während der Entwicklung der Reispflanze sind Aerenchyme in Internodien unterschiedlich ausgebildet. Die Anzahl an konstitutiv gebildeten Aerenchyemen nahm in den Internodien vom basalen zum apikalen Knoten zu. Die altersabhängige Zunahme der Aerenchyembildung konnte in jedem einzelnen Internodium beobachtet werden. Beim Vergleich der gebildeten Aerenchyme zwischen den Internodien zeigte sich, dass die älteren Internodien mehr Aerenchyme an derselben Stelle über dem basalen Knoten ausgebildet hatten als die jüngeren. Eine Entwicklungs-abhängige Aerenchyembildung ist auch in Wurzeln von *Juncus effusus* zu beobachten (Visser und Bögemann, 2006), die ebenfalls an feuchte Standorte adaptiert ist. Die Knoten von Reis besaßen keine sichtbaren Aerenchyme, sondern Interzellularen-reiche Diaphragmen. *Phragmites australis* besitzt in Knoten der Stängel und des Rhizoms Diaphragmen, die aus klein- und großporigem Sternparenchyemen aufgebaut sind (Armstrong und Armstrong, 1988; Armstrong *et al.*, 1988; Armstrong *et al.*, 1996; Afreen *et al.*, 2007). Diaphragmen der Stängel besitzen Verbindungen von den Blattaerenchyemen zur Lakune und im Rhizom von den kortikalen Aerenchyemen zur Lakune. Diese Konnektivität ist wichtig für die Gasdiffusion in *Phragmites*. Sauerstoff wird hauptsächlich über die Stomata der Blätter aufgenommen, gelangt über Blattaerenchyme zum Knoten und durch das Diaphragma in die Lakune. Hier diffundiert der Sauerstoff bis zur Wurzel. Im Rhizom bewirken die Diaphragmen aufgrund des Widerstands, den diese im Gasfluss darstellen, eine Diffusion von der Lakune in die Aerenchyme. So wird das umliegende Gewebe besser mit Sauerstoff versorgt. Wurzeln von *Melilotus siculus* besitzen ein

aerenchymatisches Phellem (Verboven *et al.*, 2012). Durch dieses poröse Gewebe ist die Versorgung der Wurzel mit Sauerstoff bei Überflutung gewährleistet. Das Rhizom von *P. australis* kann eine Porosität von 30% bis 70% (Armstrong *et al.*, 1988) und das Phellem von *M. sicularis* von 44% bis 54% (Verboven *et al.*, 2012) aufweisen. Diese hohen Porositäten sind eine Voraussetzung für die Überflutungs-Toleranz der Spezies. Diaphragmen der Reisknoten waren aus Interzellularen-reichem Gewebe aufgebaut. In dem Knoten gab es Verbindungen zwischen den Blattaerenchymen und der Lakune. Arashi und Nitta (1955) beschrieben ebenfalls eine Verbindung der Lakune mit den Aerenchymen des Blattes und des Internodiums innerhalb des Knotens. Die Porosität der ersten vier Reisknoten im Kultivar PG56 lag mit 5,5% bis 10% deutlich unter der des Rhizoms von *P. australis* oder den Wurzeln von *M. sicularis*. Aufgrund des Wachstums der beiden Spezies an Ufern und Sümpfen sind deren unterirdische Organe häufig überflutet und daher eine hohe Porosität für die Durchlüftung von Vorteil. Durch die porösen Diaphragmen in Reisknoten, den Verbindungen zwischen der Lakune und den Aerenchymen in Blättern und Internodien könnte eine verbesserte Ventilation gefluteter Organe, ähnlich der in *P. australis*, möglich sein. Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Gasdiffusion über die Lakune und den Aerenchymen wäre die Messung von Gasdrücken über definierte Stängellängen. Eine weitere Analysemethode ist die Nutzung der Röntgen-Mikro-Computertomographie. Hierbei könnten hochauflösende 3D-Scans von Stängelsegmenten herangezogen werden, um Sauerstoffdiffusionskoeffizienten in Aerenchymen und Geweben theoretisch zu berechnen. Die Methode wurde zum Beispiel in Wurzeln von *M. sicularis* genutzt (Verboven *et al.*, 2012).

Während der Überflutung von Tiefwasserreis werden das Streckungswachstum des jüngsten Internodiums (Kende *et al.*, 1998) und die Adventivwurzelbildung an den Knoten (Lorbiecke und Sauter, 1999) induziert. Bei abnehmendem Wasserspiegel sinkt die Pflanze auf die Erde, die Adventivwurzeln wachsen in den Boden ein und das jüngste

Internodium wächst negativ gravitrop. Durch die Bildung von Aerenchymen in Internodien könnte eine Erhöhung der Flexibilität erreicht worden sein, so dass der Stängel beim Absinken nicht bricht oder abknickt. Für die Untersuchung des Winkels bei dem der Reisstängel bricht und welche Kraft dafür notwendig ist, kann ein Kraft/Längen-Messgerät (Li *et al.*, 2003) genutzt werden. Hierbei können bei definierten Stängelsegmenten die Winkel und Kräfte gemessen werden, ab denen sie brechen. Dadurch könnten, bei Verwendung von gefluteten und Kontrollsegmenten, Rückschlüsse auf die Beeinflussung der Flexibilität durch Aerenchyme geschlossen werden.

Neben der verbesserten Sauerstoffverfügbarkeit und Flexibilität kann die Verringerung der Zellzahl und damit das Einsparen von ATP und Glucose eine weitere Funktion lysigen gebildeter Aerenchyme sein. So ist zum Beispiel die Trockenstress-Toleranz in Mais erhöht, wenn die Pflanzen eine verstärkte Aerenchymbildung aufweisen (Zhu *et al.*, 2010). Durch die Einsparung von Energie kann das Wurzelwachstum verstärkt und damit tiefere, Wasser-führende Erdschichten erreicht werden. Bei Phosphatmangel werden in Wurzeln von Mais und *Phaseolus vulgaris* lysigene Aerenchyme gebildet und dadurch der Bedarf an Phosphor und Energie für das Wurzelwachstum vermindert (Fan *et al.*, 2003). Auch in Reis wird bei Trockenstress die Aerenchymbildung induziert. Da dabei eine Verbesserung der Sauerstoffverfügbarkeit nicht notwendig ist, könnte die Einsparung von ATP und Assimilaten eine weitere Funktion der Aerenchyme sein.

Die Phytohormone Ethylen, Auxin und Abscisinsäure sind in die Aerenchymbildung involviert

Exogene Signale wie Überflutung und Trockenheit induzieren die Aerenchymbildung in Wurzeln von Reis (Das und Jat, 1977), *Melilotus siculus* (Teakle *et al.*, 2011), Mais (Drew *et al.*, 1989; He *et al.*, 1994, Zhu *et al.*, 2010), sowie in den oberirdischen Sprosssteilen wie Internodien und Blättern von Reis (Kapitel 1; Parlanti *et al.*, 2011).

In Reis- und Maiswurzeln sowie in Reisinternodien ist die Überflutungs-induzierte Aerenchymbildung Ethylen-abhängig (Drew *et al.*, 1981; Konings, 1982; Justin und Armstrong, 1991b; He *et al.*, 1996b; Gunawardena *et al.*, 2001). Während der Überflutung akkumuliert das gasförmige Phytohormon aufgrund der verringerten Diffusions-geschwindigkeit von Gasen in Wasser innerhalb der Pflanze (Jackson, 1985). Darüber hinaus wird die Ethylen-Biosynthese in Reisinternodien bei Überflutung erhöht (Raskin und Kende, 1984a). Es konnte gezeigt werden, dass die Ethylen-Akkumulation in Reisinternodien während der Überflutung für die Induktion der Aerenchymbildung verantwortlich ist.

In dem Tiefwasserreis-Kultivar Habiganj Aman II (HA II) konnten nach drei Tagen partieller Flutung Ethylen-Konzentrationen von 1000 ppb in der Lakune des ersten und zweiten Internodiums der gefluteten Pflanzen gemessen werden (Métraux und Kende, 1983; Stünzi und Kende, 1989). Im Tiefwasserreis-Kultivar PG56 wurde diese Ethylen-Konzentration nur im dritten Internodium bei kompletter Flutung gemessen. Bei partieller Flutung wurden in den ersten beiden Internodien geringere Ethylen-Gehalte zwischen 28 ppb und 41 ppb beobachtet. Diese Unterschiede können auf die unterschiedlichen Reisvarietäten zurückführbar sein oder durch abiotische Faktoren hervorgerufen worden sein. In den Experimenten mit dem Kultivar HA II wurden die Pflanzen zum Beispiel mit höheren Lichtintensitäten und Temperaturen behandelt. Ethylen-Gehalte von 30 ppb scheinen auszureichen, um die Aerenchymentwicklung zu fördern. Dadurch wurde die Porosität der Internodien erhöht. So stieg zum Beispiel durch Ethylen die Porosität im zweitjüngsten Internodium von 3% auf bis zu 7% an. Im ersten Knoten konnte ebenfalls eine Porositätssteigerung beobachtet werden. In den älteren Knoten schien die Diaphragmaentwicklung abgeschlossen zu sein und Ethylen keinen induktiven Effekt auszulösen.

Neben Ethylen sind auch andere Phytohormone in die Aerenchymbildung involviert. Das natürliche Auxin Indol-3-essigsäure (IAA) ist der wichtigste Vertreter der Auxine, jedoch in wässriger Lösung instabil. Daher werden in

biologischen Untersuchungen oft synthetische Auxine eingesetzt, die eine höhere Stabilität aufweisen. Das synthetische Auxin 1-Naphthyllessigsäure (1-NAA) inhibierte in Konzentrationen zwischen 100 nM und 10 µM die Aerenchymbildung in Maiswurzeln (Konings und de Wolf, 1984), während geringere Konzentrationen von 1 nM bis 10 nM 1-NAA die Aerenchymentwicklung förderten (Justin und Armstrong, 1991a). Die Induktion der Aerenchymbildung könnte auf eine durch Auxin erhöhte Ethylenbiosynthese zurückzuführen sein. Solch eine Auxin-vermittelte Induktion der Ethylenbiosynthese wurde in *Vigna radiata* und *Pisum sativum* beobachtet (Yang und Hoffman, 1984). In Reisinternodien von PG56 hat 1-NAA in der Konzentration von 1 µM keinen Einfluss auf die Aerenchymbildung. Auch die Inhibition des PIN-vermittelten Auxintransports mit 1-N-Naphthylphtalaminsäure (NPA; Friml und Palme, 2002; Vieten *et al.*, 2005; Forestan und Varotto, 2012) beeinflusste die Aerenchymbildung nicht direkt. Die durch Ethylen geförderte Aerenchymentwicklung wurde durch NPA reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass die Ethylen-induzierte Aerenchymbildung vom polaren Auxintransport abhängig sein kann.

Die Konzentrationen und Responsivitäten zu den Hormonen Abscisinsäure (ABA) und Gibberellin (GA) werden in Reis während der Überflutung und bei Trockenstress verändert (Fukao *et al.*, 2006; Saika *et al.*, 2007; Bailey-Serres und Voesenek, 2008; Fukao und Bailey-Serres, 2008; Voesenek und Bailey-Serres, 2009; Fukao *et al.*, 2011; Bailey-Serres *et al.*, 2012). Diese Phytohormone könnten die Ethylen-vermittelte Aerenchymbildung beeinflussen. Für Ethylen-abhängige morphologische und metabolische Anpassungen von Reis an Überflutung sind unter anderem Ethylen-responsive Faktoren (ERFs) der Gruppe VII der APETALA2/ERF-Superfamilie verantwortlich (Fukao *et al.*, 2006; Fukao und Bailey-Serres, 2008; Voesenek und Bailey-Serres, 2009; Fukao *et al.*, 2011; Bailey-Serres *et al.*, 2012). In allen Reisvarietäten sind im polygenetischen Locus SUBMERGENCE1 (SUB1) die ERFs SUB1B und SUB1C kodiert. Überflutungs-tolerante Reiskultivare besitzen zusätzlich

SUB1A. Expression von *SUB1A* bei Überflutung führt zu einer verminderten Responsivität zu GA durch Akkumulation der DELLA-Proteine SLENDER RICE-1 (SLR1) und SLR1 LIKE-1 (SLRL1), die GA-Signalrepressoren sind, und einer stärkeren ABA-Responsivität. Die verminderte GA-Responsivität führt während der Überflutung zu einer Wachstumsinhibierung und verringertem Kohlenhydratverbrauch. Die erhöhte ABA-Antwort führt zum Beispiel bei nachfolgendem Trockenstress zu einer verstärkten Expression von LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT-Proteinen (LEA-Proteinen) und zu einer Unterdrückung des Wasserverlustes in den Blättern (Voeselek und Bailey-Serres, 2009; Fukao *et al.*, 2011).

Tiefwasserreis-Kultivare besitzen den Gruppe VII ERF SUB1A nicht (Bailey-Serres und Voeselek, 2008; Voeselek und Bailey-Serres, 2009). In diesen Varietäten wird die Ethylen-vermittelte Überflutungsantwort durch zwei andere ERF-Transkriptionsfaktoren der Gruppe VII SNORKEL1 (SK1) und SNORKEL2 (SK2) vermittelt (Hattori *et al.*, 2009). Durch die Akkumulation von Ethylen bei Überflutung wird die ABA-Konzentration durch Degradierung von aktiver ABA durch die ABA-8'-Hydroxylase verringert, die Biosynthese Ethylen-unabhängig unterdrückt und *SK1* und *SK2* exprimiert (Saika *et al.*, 2007; Bailey-Serres und Voeselek, 2008; Voeselek und Bailey-Serres, 2009). Das führt zu einer erhöhten GA-Biosynthese und -Responsivität und dadurch zu einer verstärkten Zellelongation im jüngsten Internodium.

Im Tiefwasserreis-Kultivar PG56 hatten GA und ABA alleine keinen Einfluss auf die Aerenchymbildung in Internodien. Die Ethylen-vermittelte Aerenchymentwicklung wurde durch ABA erhöht. Da bei Überflutung die ABA-Konzentration im Tiefwasserreis abnimmt, könnte in weiteren Experimenten die vorliegenden ABA-Konzentrationen in den Internodien gefluteter Pflanzen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen (Ciha *et al.*, 1977) und durch Inkubation von Stängelsegmenten mit verschiedenen Konzentrationen an ABA eine mögliche Beeinflussung der Aerenchymbildung untersucht werden.

Neben Überflutung induziert Trockenstress die Aerenchymbildung in Reisinternodien. Da Wassermangel zum Beispiel in Reis zu einer Akkumulation von ABA in Blättern führt (Sauter *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2011) könnte eine ABA-abhängige Induktion der Aerenchymbildung zu einer erhöhten Trockenstress-Toleranz führen. Inhibition der ABA-Biosynthese über die 9-cis-Epoxy-carotenoid-Dioxygenase (NCED; Xiong und Zhu, 2003; Ren *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2011) zeigte keine Beeinflussung der Trockenstress-induzierten Aerenchymbildung. Das Enzym katalysiert die oxidative Spaltung des Neoxanthins zum Xanthoxin, einer Vorstufe der ABA. Somit ist entweder noch genügend ABA in den Internodien für eine Induktion der Aerenchymbildung vorhanden, diese ist ABA-unabhängig oder NCED wurde nicht vollständig inhibiert. Da ABA auch konjugiert mit Glukose als inaktive Speicher- und Transportform in der Pflanze vorliegen kann, könnte bei Trockenstress ausreichend ABA durch Spaltung dieser Konjugate vorliegen. Man könnte die Konzentrationen an freier ABA und dem ABA-Glukosylester mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) in den Internodien bestimmen (López-Carbonell *et al.*, 2009). Weitere Untersuchungen mit höheren Inhibitorkonzentrationen oder längeren Inkubationszeiten könnten ebenfalls zur Aufklärung hilfreich sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ethylen die Aerenchymbildung in Reisinternodien induziert und Auxin, sowie ABA, in der Ethylen-induzierten Bildung beteiligt sind oder eine regulatorische Rolle spielen. Beim Fehlen des Ethylen-Signals unterbleibt die Aerenchymbildung. So wird die Aerenchymentwicklung durch drei Tage hypoxische Bedingungen bei 5% Sauerstoff oder bei Unterbindung der internen Gasdiffusion durch Füllen der Lakune mit Wasser nicht induziert. Beide Behandlungen könnten die Ethylenbiosynthese fördern, da Sauerstoffmangel wie in Maiskeimlingen (He *et al.*, 1996a) und Reisinternodien (Cohen und Kende, 1987) beschrieben die Ethylenbiosynthese durch Aktivitätserhöhung der 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure-Synthase induziert. Ohne das umgebene Wasser diffundierte das gebildete gasförmige Phytohormon

aus der Pflanze und durch ausbleibende Akkumulation wurde die Aerenchymbildung nicht induziert.

Bei hypoxischen Bedingungen reicht die ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung nicht für die Versorgung der Stoffwechselprozesse. Eine metabolische Anpassung ist die ATP-Synthese über anaerobe Prozesse wie zum Beispiel der alkoholischen Gärung. Hierbei werden nur zwei Moleküle ATP aus einem Molekül Glukose gewonnen. Bei der oxidativen Phosphorylierung werden weitere 34 Moleküle ATP synthetisiert. Anaerobe Energiegewinnung ist für das Überleben der Pflanze bei hypoxischen Bedingungen von essentieller Bedeutung, jedoch ist diese ineffektiver als die aerobe ATP-Synthese.

In *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass die Ethylen-induzierte Expression der Gruppe VII ERFs RAP2.2 (Hinz *et al.*, 2010) und ERF73/HRE1 (Hess *et al.*, 2011) bei der Induktion der Alkoholdehydrogenase (ADH) von Bedeutung sind. ADH katalysiert die Reaktion vom Acetaldehyd zu Ethanol in der alkoholischen Gärung und deren Aktivität wird durch Sauerstoffmangel in Reis in Koleoptilen, Wurzeln und Blättern (Xie und Wu, 1989; Kato-Noguchi und Morokuma, 2007; Agarwal *et al.*, 2007) und im Tiefwasserreis-Kultivar PG56 in den ersten drei Internodien erhöht. Am stärksten war die Zunahme der ADH-Aktivität in Internodien von partiell gefluteten Pflanzen des Kultivars PG56 mit dem dritten Blatt unter Wasser. Am schwächsten war die Aktivitätszunahme bei kompletter Flutung der Pflanze, obwohl hier die Ethylen-Konzentrationen am höchsten waren. PG56 ist ein Überflutungsintoleranter Kultivar und induziert verstärktes Streckungswachstum des jüngsten Internodiums bei Überflutung (Bailey-Serres und Voesenek, 2008; Voesenek und Bailey-Serres, 2009). Wenn die Pflanze keinen Kontakt zu atmosphärischem Sauerstoff bekommt und komplett geflutet bleibt, stirbt sie innerhalb weniger Tage aufgrund ATP-Mangels ab. Neben Ethylen ist Sauerstoff ein weiteres Signal bei der Induktion der ADH-Aktivität (Andrews *et al.*, 1993). Es scheint für die ADH-Enzymaktivität ein Grenzwert der Sauerstoffkonzentration zu existieren, bei dem die optimale

Induktion der ADH stattfindet. Fällt der Sauerstoffgehalt durch anhaltende komplette Flutung der Pflanze unter einem bestimmten Wert, ist auch die ADH-Aktivität verringert. In Maiswurzeln und -koleoptilen ist die stärkste Induktion der ADH-Aktivität bei 4% Sauerstoff zu finden (Andrews *et al.*, 1993). Höhere oder auch geringere Sauerstoffkonzentrationen führten zu einer schwächeren ADH-Aktivität in den Organen. Die Sauerstoffkonzentrationen unterschieden sich in den Lakunen bei partieller und kompletter Flutung nur im ersten Internodium voneinander. Mit 17,6% Sauerstoff bei partieller, 11,7% bei kompletter und 14,0% bei der partiellen Flutung mit dem dritten Blatt unter Wasser war die ADH-Aktivität bei der letztgenannten Flutung am höchsten. Daher scheint eine Sauerstoffkonzentration von 14% in der Lakune des ersten Internodiums die stärkste Induktion der ADH-Enzymaktivität zu induzieren. Im zweitjüngsten Internodium waren die Sauerstoffgehalte Flutungsunabhängig, die ADH-Aktivitäten der komplett gefluteten Pflanzen gering. Daher scheint es bei der Induktion der ADH-Enzymaktivität in Reis, wie bei der Aerenchymbildung, neben Ethylen noch weitere Signale zu geben. Sauerstoffmangel induziert die ADH-Aktivität auch in Reisblättern (Xie und Wu, 1989). Die Blätter besitzen konstitutiv gebildete Aerenchyme, um eine erleichterte Diffusion von Sauerstoff in die Pflanze zu gewährleisten. Durch die Sauerstoffversorgung über die Stomata ist die Grundaktivität der ADH in Blättern ca. 100-fach geringer als in den Internodien. Jedoch verzehnfachte sich die Aktivität in Blattteilen, die bei partieller Flutung unter Wasser waren. In den Teilen über der Wasseroberfläche stieg die ADH-Aktivität nur schwach und nicht signifikant an. Das zeigt, dass die Aktivitätsänderungen nicht das gesamte Organ betreffen müssen, sondern auch selektiv nur in Teilen stattfinden kann, die von der Sauerstofflimitierung betroffen sind.

$O_2^{\cdot -}$ inhibiert, H_2O_2 induziert Aerenchymbildung in Reisinternodien

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind als *second messenger* in Zelltodprozessen wie zum Beispiel der hypersensitiven Reaktion (Mur *et*

al., 2007) und der lysigenen Aerenchymbildung in Maiswurzeln (Yamauchi et al., 2011) zu finden. ROS fördern ebenfalls epidermalen Zelltod in Reisknoten (Steffens und Sauter, 2009a) und Aerenchymentwicklung in Reisinternodien (Kapitel 1).

In Präaerenchymzellen der Reisinternodien, Zellen die durch programmierten Zelltod Aerenchyme bilden, sind konstitutiv Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxidanion-Radikale ($O_2^{\bullet-}$) zu finden. Zusätzlich war während der Ethylen-induzierten Aerenchymbildung als frühe Antwort eine Konzentrationserhöhung von $O_2^{\bullet-}$ zu beobachten. Diese Konzentrationserhöhung war ein erster Hinweis auf die Signaltransduktion mittels ROS.

Das $O_2^{\bullet-}$ ist hochreaktiv. $O_2^{\bullet-}$ wird zum Beispiel über eine Plasmamembranständige NADPH-Oxidase gebildet. Das Enzym katalysiert die Reaktion von NADPH und molekularem Sauerstoff zum $NADP^+$ und $O_2^{\bullet-}$. Ein detoxifizierendes Enzym ist Superoxid-Dismutase (SOD). SOD katalysiert die Reaktion von $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 . NADPH-Oxidase-gebildete ROS sind als *second messenger* im Signalweg bei Sauerstoffmangel in *Arabidopsis thaliana* involviert (Baxter-Burrell et al., 2002; Pucciariello et al., 2012ab). So induzieren die bei Anoxie gebildeten ROS die Transkription von Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren und die Expression von ADH. Dadurch wird die Toleranz der Pflanze gegenüber Sauerstoffmangel erhöht.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Inhibierung der ROS-Biosynthese über NADPH-Oxidase die Aerenchymbildung in den Reisinternodien förderte. Da in den Präaerenchymen konstitutiv H_2O_2 und $O_2^{\bullet-}$ nachgewiesen wurden und Ethylen eine Konzentrationserhöhung von $O_2^{\bullet-}$ zur Folge hat, könnte eine der beiden Spezies einen inhibierenden Effekt auf die Aerenchymbildung haben, da die Inhibition der ROS-Biosynthese die Aerenchymentwicklung fördert.

Durch Hemmung der SOD wurde die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration intrazellulär erhöht und die Aerenchymbildung im Internodium unterblieb. Ethylen konnte die unterbliebene Aerenchymbildung nicht fördern. Die Inhibition der Aerenchymentwicklung durch $O_2^{\bullet-}$ beruht nicht auf einem Absterben

der Präaerenchymzellen. Die Radikale könnten Komponenten der Signaltransduktion beeinflussen.

Im Gegensatz dazu führte exogen appliziertes oder durch Inhibition der Katalaseaktivität endogen akkumuliertes H_2O_2 in Tiefwasserreis zu einer Konzentrations-abhängigen Induktion der Aerenchymbildung. Die Inhibition der Ethylen-Rezeptoren hatte keine Auswirkungen auf die H_2O_2 -vermittelte Induktion der Aerenchymentwicklung. Daher scheint H_2O_2 in der Signalweiterleitung Ethylen nachgeschaltet zu sein.

Die Entgiftung von H_2O_2 kann auch durch die nicht-enzymatischen Antioxidantien Metallothioneine (MT) erfolgen. In Reis binden *MT1a* und *MT2b* H_2O_2 mit hoher Affinität (Wong *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009). Konstitutive Herunterregulation von *MT2b* führte zu einer Verstärkung der hypersensitiven Antwort in Reisblättern (Wong *et al.*, 2004) und einer Erhöhung des epidermalen Zelltods in den Reisknoten (Steffens und Sauter, 2009a). Darüber hinaus wiesen Reispflanzen, die *MT1a* überexprimierten, eine erhöhte Trockenstress-Toleranz auf (Yang *et al.*, 2009). Reispflanzen mit konstitutiv herunterreguliertem *MT2b* zeigten eine erhöhte Anzahl an Entwicklungs-abhängig gebildeten Aerenchymen in den Internodien (Kapitel 1). Auch Überflutungs-abhängig wurde eine stärkere Aerenchymbildung in den Internodien induziert. Die Ergebnisse legen nahe, dass die ROS-vermittelte Signaltransduktion der Aerenchymbildung von *MT2b* abhängig sein kann. Eine Überflutungs- und Ethylen-abhängige Regulation der Expression des *MT2b* kann beim epidermalen Zelltod in Reis (Steffens und Sauter, 2009a) und der lysigenen Aerenchymbildung in Maiswurzeln (Rahji *et al.*, 2011) beobachtet werden. Weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel qRT-PCR-Analysen, könnten zeigen, ob auch bei der Aerenchymentwicklung in Reisinternodien die Expression von Metallothioneine Ethylen-abhängig reguliert werden.

Das Verhältnis zwischen H_2O_2 und $O_2^{\bullet-}$ scheint bei der Aerenchymbildung im Internodium von Bedeutung zu sein. Eine Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration fördert die Aerenchymbildung, während eine Erhöhung der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration diese inhibiert. Das Fehlen von durch die NADPH-

Oxidase gebildetem $O_2^{\bullet-}$ führte zu einer verstärkten Aerenchymbildung, was auf die fehlende Inhibition durch $O_2^{\bullet-}$ zurückgeführt werden kann. Ethylen führt zu einer frühen Erhöhung der $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration, welches voraussichtlich enzymatisch, zum Beispiel durch eine Superoxid-Dismutase, zu H_2O_2 umgesetzt wird und die Aerenchymbildung fördert. Eine ähnliche Rolle der beiden ROS wurde in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* beobachtet (Dunand *et al.*, 2007). $O_2^{\bullet-}$ war in der Elongationszone und H_2O_2 am stärksten in der Differenzierungszone der Wurzel zu finden. Eine Konzentrationsabnahme von $O_2^{\bullet-}$ hatte eine Abnahme der Wurzelelongation und der Wurzelhaarbildung zur Folge. Geringere H_2O_2 -Konzentrationen führten zu einer Zunahme der Wurzelelongation und zu reduzierter Wurzelhaarbildung. In die Wurzelhaarbildung ist das Hydroxyl-Radikal (OH^{\bullet}) involviert und ein Fehlen von H_2O_2 als Vorstufe führt zur Inhibition. In der *Arabidopsis*-Wurzel sind die beiden untersuchten ROS in unterschiedliche Wachstumsprozesse involviert und auch in der Aerenchymbildung in Reisinternodien nehmen sie eine antagonistische Rolle ein. Die weiteren ROS wurden nicht analysiert. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Farbstoffe Hydroxyphenyl-Fluorescein (Kwasniewski *et al.*, 2013) und 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (Steffens *et al.*, 2013) könnte eine mögliche Induktion der Bildung von den ROS Hydroxyl-Radikal und Peroxynitrit untersucht werden. Für die Identifikation von möglichen weiteren Komponenten der Signaltransduktion könnten Microarray-Analysen hilfreich sein. Hierbei wären Expressionsstudien von überflutetem und Kontrollgewebe möglich. Das präaerenchymatische Gewebe könnte mittels Laser-Mikrodissektion isoliert, die RNA extrahiert und mittels Microarray-Analysen weiter untersucht werden.

Zelluläre Charakterisierung der Präaerenchymzellen

Bei der lysigenen Aerenchymbildung sterben die Zellen durch programmierten Zelltod ab. Lysigene Aerenchymentwicklung ist in Wurzeln zum Beispiel von Weizen (Trought und Drew, 1980), Mais (Drew *et al.*, 1981) und Reis (Kawai *et al.*, 1998) zu finden. In Reisinternodien

gibt es Präaerenchymzellen und deren Lyse führt zur Aerenchymbildung. Präaerenchymzellen weisen charakteristische Unterschiede zu den umliegenden Parenchymzellen auf (Abbildung 18). Sie besitzen eine große Zentralvakuole und nahezu keine Chloroplasten. Durch das Fehlen der Chloroplasten haben Präaerenchymzellen wenig Stärke gespeichert. Das könnte vorteilhaft für den späteren Zelltod der Zellen sein, da die Stärke nicht in andere Zellen transportiert werden muss oder verloren geht. Die Zellwand der Präaerenchymzellen ist dünner als die der umliegenden Parenchymzellen. Sie ist Cellulose-reich, aber im Gegensatz zu den umgebenen Parenchymzellen nicht lignifiziert (unveröffentlicht, Master-Arbeit, Anna-Catharina Wollmer, 2012). In *Astrocaryum jauari* haben die um ein Aerenchym liegenden Zellen eine dickere Zellwand, vermutlich um einen Kollaps der Aerenchyme bei steigenden Wasserdruck durch Überflutung zu verhindern (Schlüter *et al.*, 1993). In Reisinternodien könnten Aerenchyme die Stabilität der Stängel schwächen. Durch die lignifizierten Zellwände der Parenchymzellen könnte eine geringere Stabilität kompensiert werden. Eine nicht-lignifizierte Zellwand der Präaerenchyme erleichtert darüber hinaus deren Abbau durch Cellulasen. Einige der inneren Zellen der Präaerenchymfelder in Reisinternodien waren konstitutiv tot. Sie besaßen einen Defekt der Plasmamembran, deren Zellwand wurde noch nicht abgebaut. In Reis werden Aerenchyme während der Entwicklung gebildet und durch Überflutung gefördert. Daher könnten während der Entwicklung der Pflanze Zellen bereits abgestorben sein.

Heterotrimere G-Proteine könnten an der Entwicklung der Präaerenchymfelder beteiligt sein. G-Proteine spielen in vielen Zelltod-Signalwegen eine Rolle. So sind G-Proteine bei der Aerenchymbildung in der Maiswurzel (He *et al.*, 1996b) und im epidermalen Zelltod in Reis (Steffens und Sauter, 2009b) involviert. Pflanzen des Wildtyps besaßen zwischen den Präaerenchymzellen große Interzellularen, die in *d1*-Pflanzen, die einen Defekt in der G α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine aufweist, fehlten. Die Aerenchymbildung in Internodien könnte

G α -unabhängig sein. Heterotrimere G-Proteine könnten aber an der Entwicklung der Präaerenchymzellen beteiligt sein. Pharmakologische Untersuchungen mit GTP- γ -S, einem G-Protein-aktivierenden, und GDP- β -S einem G-Protein-inaktivierenden Molekül, könnten die Zusammenhänge zwischen der Entwicklung des präaerenchymatischen Gewebes und der Beteiligung von G-Proteinen klären.

Präaerenchymzellen unterscheiden sich konstitutiv von den umliegenden Parenchymzellen und der Zelltod läuft zeitlich koordiniert ab. Die Präaerenchymzellen besaßen entwicklungsabhängig einen höheren Anteil an deformierten Zellkernen, der in jüngerem Gewebe, 1 cm über dem zweiten Knoten, durch Ethylen gefördert wurde (Abbildung 18; unveröffentlicht, Master-Arbeit, Anna-Catharina Wollmer, 2012). Die Deformationen können auf den eingesetzten Zelltodprozess der Zellen zurückgeführt werden. Es ist möglich, dass die Zellkerne abgebaut werden. Um Stickstoff nicht zu verlieren, könnte DNA in den Zellkernen der sterbenden Zellen abgebaut werden. Da nur 6% der Zellen des Internodiums Präaerenchymzellen sind, war ein Nachweis möglicher DNA-Degradierung nur mit einem sensitiven, Zell-spezifischen Test, der TUNEL-Methode, möglich. Mit der Methode wurde der DNA-Abbau in Zelltodprozessen in *Aponogeton madagascariensis* (Gunawardena et al., 2004; Lord et al., 2011), in *Arabidopsis thaliana* (Zhu und Rost, 2000) und in Mais (Gunawardena et al., 2001) nachgewiesen. Auch in den Präaerenchymzellen der Reisinternodien konnten TUNEL-positive Kerne und damit degradierte DNA visualisiert werden. Die DNA-Degradierung konnte in Kontrollen und in Ethephon-behandelten Segmenten beobachtet werden. Da die Aerenchymbildung in den Internodien ein Bestandteil der Entwicklung der Reispflanze ist, ist der generelle Nachweis von degradiertem DNA in Präaerenchymzellen zu erwarten. Doch das Vorhandensein nur einzelner TUNEL-positiver Kerne in der behandelten Probe legt nahe, dass die Präaerenchymzellen nacheinander einzeln absterben und nicht mehrere oder alle Zellen auf einmal. Diese Beobachtung wird auch durch mikroskopische Untersuchungen der

Aerenchyme gestützt. Die Aerenchymbildung beginnt mittig in den Präaerenchymfeldern und breitet sich von dort radial weiter aus. Kawai et al. (1998) beschrieben bei der Aerenchymbildung in der Reiswurzel einen definierten Ablauf, bei dem der Zelltod in den größten Zellen in der fünften Zellreihe des Wurzelkortex begann und sich dann aufgrund des Verlustes der Zell-Zell-Kontakte in radialer Richtung ausbreitete. Die mikroskopischen Beobachtungen der Aerenchyme, die mittige Lokalisation deformierter Zellkerne und der vereinzelt DNA-Abbau legen nahe, dass die Aerenchymentwicklung in den Reisinternodien ebenfalls in der Mitte der Präaerenchymfelder beginnt und sich radial ausbreitet.

In tierischem Gewebe geht dem Zelltod oft eine Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur, die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und letztendlich die Abgabe von Cytochrom c voraus (Reape und McCabe, 2008; Reape et al., 2008). Auch während pflanzlicher Zelltodprozesse wurde eine Veränderung der Ultrastruktur in *Arabidopsis thaliana* (Díaz-Tielas et al., 2012) und in *Aponogeton madagascariensis* (Lord et al., 2011) beobachtet. Hierbei war die Matrix kondensiert und die Cristae erweitert. In Präaerenchymzellen der Reisinternodien konnten diese Veränderungen in 89% der Zellen konstitutiv beobachtet werden (Abbildung 18). Diese Veränderungen deuten auf einen Verlust der Mitochondrienfunktionen, wie der ATP-Synthese, und dem Abbau der Mitochondrien hin.

Ein weiteres Charakteristikum des Zelltods ist die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, welches in *Arabidopsis*-Wurzeln (Díaz-Tielas et al., 2012), *Arabidopsis*-Protoplasten aus Blättern (Yao et al., 2004) und Reis-Protoplasten aus Kallusgewebe (Qi et al., 2011) zu beobachten war. Die Abnahme des Transmembranpotentials ist ein Anzeichen für den Verlust der Mitochondrien-Funktion. Untersuchungen an Präaerenchym- und Parenchymzellen in den Reisinternodien konnten keine Unterschiede im mitochondrialen Membranpotential aufzeigen. Das bedeutet, dass die äußere Membran der Mitochondrien intakt ist. Eine

Aussage über die Funktionalität der Organellen kann dadurch nicht getroffen werden.

Während des Zelltods in *Aponogeton madagascariensis* konnten die Mitochondrien der sterbenden Zellen definiert werden (Lord *et al.*, 2011). Mitochondrien der Kategorie 1 waren in Zellen vorhanden, die noch keine Zeichen von Zelltod zeigten. Diese Mitochondrien besaßen intakte Membranen und Cristae, lagen vereinzelt vor und bewegten sich im Cytosol. Im frühen Stadium des Zelltods lagen Mitochondrien der Kategorie 2 in kleinen Clustern aggregiert vor und bewegten sich diffuser und schneller als Kategorie 1-Mitochondrien. In der Kategorie 3 waren Mitochondrien aggregiert, wiesen kaum Bewegung auf, zeigten degradierte Cristae und diffuse Membranen. Die Mitochondrien der Kategorie 4 konnten mit Mitochondrien-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen nicht mehr angefärbt werden, zeigten stark degradierte Cristae und nahezu nicht erkennbare Membranen. Eine Bewegung der Mitochondrien konnte nicht nachgewiesen werden. Die Mitochondrien-Mobilität ist in den Präaerenchymzellen der Reisinternodien gegenüber den Parenchymzellen unverändert. Ethylen hatte keinen Einfluss auf die Beweglichkeit der Mitochondrien. Es scheint während des Zelltod-Prozesses keine Einschränkung der Mitochondrien-Mobilität aufzutreten. Eine verstärkte Clusterbildung der Mitochondrien der inneren Präaerenchymzellreihe konnte beobachtet werden (Abbildung 18). Die Funktion der Aggregate ist bisher noch ungeklärt. Lord *et al.* (2011) vermuten, dass die Mitochondrien in den Aggregaten vom Cytosol in die Vakuole transportiert werden, um dann abgebaut zu werden. Welche Funktion die Aggregation der Mitochondrien hat konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die Länge der Mitochondrien in den Präaerenchymzellen betrug zwischen 500 nm und 1 μm . Es konnten 2 μm bis 3 μm große Mitochondrien in vier Zellen visualisiert werden. In *Pisum sativum* konnten bei der Blatt-Seneszenz ebenfalls große Mitochondrien gefunden werden (Simeonova *et al.*, 2004). Die Mitochondrien waren nahezu kreisrund und wiesen an

verschiedenen Stellen unterschiedliche Membranpotentiale auf. Van Gestel und Verbelen (2002) beschrieben die Bildung von Megamitochondrien aufgrund von Sauerstoffmangel in Tabak-Zellkulturen. Hierbei fusionierten reversibel Mitochondrien und konnten bis zu 80 µm lang werden. Über deren Funktion ist bisher noch nichts bekannt. Ob die beobachteten Mitochondrien in den Präaerenchymen auch durch eine reversible Fusion einzelner Mitochondrien entstanden und warum sie gebildet wurden, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden. Mit Hilfe von unterschiedlichen Fluoreszenz-Markerproteinen für die innere (zum Beispiel Proteine der Atmungskette) und äußere Mitochondrienmembran (zum Beispiel Porine) wäre eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Fusion der Mitochondrien beobachtbar. Inhibition von Zytoskelett-Komponenten über Colchicine oder Cytochalasin D könnte deren Beteiligung an der Fusion aufklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aerenchymbildung in der Mitte der Präaerenchymfelder beginnt und sich in radialer Richtung ausbreitet. Dabei degradiert zuerst die Plasmamembran und später der Tonoplast (unveröffentlicht, Master-Arbeit, Anna-Catharina Wollmer, 2012). Durch den Verlust der Zell-Zell-Kontakte könnte das Zelltodsignal an benachbarte Zellen weitergegeben werden (Kawai *et al.*, 1998). Während des Zelltodprozesses degradiert die DNA. Die Ultrastruktur der Mitochondrien ist degeneriert und die Mitochondrien aggregieren. Das deutet auf den Verlust der Mitochondrienfunktion und dem baldigen Abbau der Mitochondrien hin.

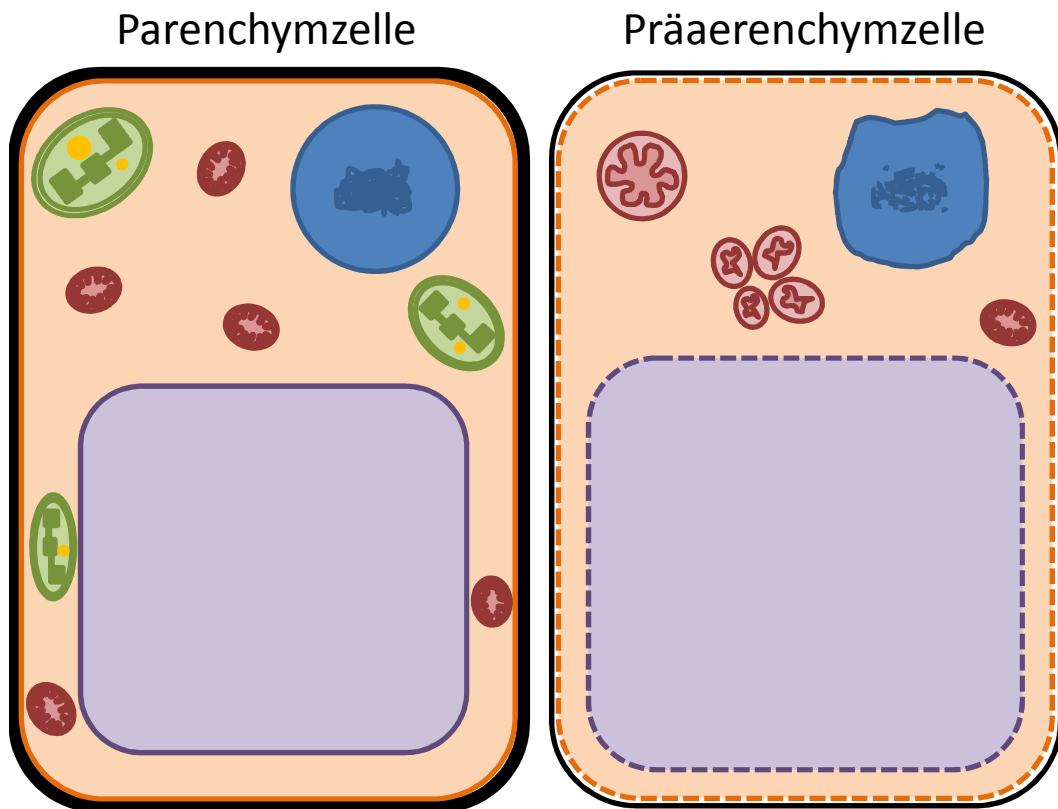


Abbildung 18: Zelluläre Charakteristika der Präaerenchymzellen. Präaerenchymzellen besitzen eine dünnere Zellwand (schwarz), eine große Vakuole (lila), keine Chloroplasten (grün) und nahezu keine Stärke (gelb). Während des Zelltodprozesses treten Defekte der Plasmamembran (orange), des Tonoplasten (lila), Deformationen des Zellkerns (blau) und Degradierung der DNA auf. Die Mitochondrien (rot) weisen eine kondensierte Matrix und erweiterte Cristae auf. Sie aggregieren und vereinzelt sind sehr große Mitochondrien in Präaerenchymzellen zu beobachten.

Literatur

Adams DO, Yang SF (1979) Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 170-174

Afreen F, Zobayed SMA, Armstrong J, Armstrong W (2007) Pressure gradients along whole culms and leaf sheaths, and other aspects of humidity-induced gas transport in *Phragmites australis*. *J Exp Bot* 58: 1651-1662

Agarwal S, Kapoor A, Lakshmi OS, Grover A (2007) Production and phenotypic analysis of rice transgenics with altered levels of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase proteins. *Plant Physiol Biochem* 45: 637-646

Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148-2152

Arashi K, Nitta H (1955) Studies on the lysigenous intercellular space as the ventilating system in the culm of rice and some other graminaceous plants. *Proc Crop Sci Soc Jpn* 24: 78-81

Armstrong J, Armstrong W (1988) *Phragmites australis* - A preliminary study of soil-oxidizing sites and internal gas transport pathways. *New Phytol* 108: 373-382

Armstrong J, Armstrong W, Beckett PM (1988) *Phragmites australis*: a critical appraisal of the ventilating pressure concept and an analysis of resistance to pressurized gas flow and gaseous diffusion in horizontal rhizomes. *New Phytol* 110: 383-389

Armstrong J, Armstrong W, Beckett PM, Halder JE, Lythe S, Holt R, Sinclair A (1996) Pathways of aeration and the mechanisms and beneficial effects of humidity- and Venturi-induced convections in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Aquat Bot* 54: 177-197

Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs DJ, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voeselek LACJ, van Dongen JT (2012) Making sense of low oxygen sensing. *Trends Plant Sci* 17: 129-138

Bailey-Serres J, Voeselek LACJ (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol* 59: 313-339

Balk J, Leaver CJ (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. *Plant Cell* 13: 1803-1818

Balk J, Leaver CJ, McCabe PF (1999) Translocation of cytochrome *c* from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett* 463: 151-154

Baxter-Burrell A, Yang Z, Springer PS, Bailey-Serres J (2002) RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science* 296: 2026-2028

Ben-Ari G (2012) The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 31: 1357-1369

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91: 179-194

Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK, Murphy TM (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol* 116: 1379-1385

Bolwell GP, Wojtaszek P (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* 51: 347-366

Cara B, Giovannoni JJ (2008) Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Sci* 175: 106-113

Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544

Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277: 19861-19866

Ciha AJ, Brenner ML, Brun WA (1977) Rapid separation and quantification of abscisic acid from plant tissues using high performance liquid chromatography. *Plant Physiol* 59: 821-826

Cohen E, Kende H (1987) *In vivo* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity in internodes of deepwater rice: enhancement by submergence and low oxygen levels. *Plant Physiol* 84: 282-286

Colmer TD (2003) Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.). *Ann Bot* 91: 301-309

Cooke AR, Randall DI (1968) 2-Haloethanephosphonic acids as ethylene releasing agents for the induction of flowering in pineapples. *Nature* 218: 974-975

Das DK, Jat RL (1977) Influence of three soil-water regimes on root porosity and growth of four rice varieties. *Agron J* 69: 197-200

De Bary A (1884) Comparative anatomy of the vegetative organs of the phanerogams and ferns. Oxford

Denness L, McKenna JF, Segonzac C, Wormit A, Madhou P, Bennet M, Mansfield J, Zipfel C, Hamann T (2011) Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 156: 1364-1374

Díaz-Tielas C, Graña E, Sotelo T, Reigosa MJ, Sánchez-Moreiras AM (2012) The natural compound trans-chalcone induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell Environ* 35: 1500-1517

Domínguez F, Moreno J, Cejudo FJ (2004) A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death. *J Biol Chem* 279: 11530-11536

Drew MC, He CJ, Morgan PW (1989) Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen- or phosphate-starvation in adventitious roots of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 91: 266-271

Drew MC, He CJ, Morgan PW (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* 5: 123-127

Drew MC, Jackson MB, Giffard SC, Campbell R (1981) Inhibition by silver ions of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to exogenous ethylene or to oxygen deficiency. *Planta* 153: 217-224

Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol* 174: 332-341

Evans DE (2003) Aerenchyma formation. *New Phytol* 161: 35-49

Fan M, Zhu J, Richards C, Brown KM, Lynch JP (2003) Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. *Funct Plant Biol* 30: 493-506

Feraru E, Friml J (2008) PIN polar targeting. *Plant Physiol* 147: 1553-1559

Fernandez-Maculeit JC, Dong JG, Yang SF (1993) Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by carbon dioxide. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 1168-1173

Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10: 76-100

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446

Forestan C, Varotto S (2012) The role of PIN auxin efflux carriers in polar auxin transport and accumulation and their effect on shaping maize development. *Mol Plant* 5: 787-798

Friml J, Palme K (2002) Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Mol Biol* 49: 273-284

Fukao T, Bailey-Serres J (2004) Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? *Trends Plant Sci* 9: 449-456

Fukao T, Bailey-Serres J (2008) Submergence tolerance conferred by *Sub1A* is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16814-16819

Fukao T, Xu K, Ronald PC, Bailey-Serres J (2006) A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell* 18: 2021-2034

Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J (2011) The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. *Plant Cell* 23: 412-427

Gaff DF, Okong'O-Ogola (1971) The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *J Exp Bot* 22: 756-758

Gibbs DJ, Lee SC, Isa NM, Gramuglia S, Fukao T, Bassel GW, Correia CS, Corbineau F, Theodoulou FL, Bailey-Serres J, Holdsworth MJ (2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* 479: 415-418

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909-930

Gunawardena AHLAN, Greenwood JS, Dengler NG (2004) Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *Plant Cell* 16: 60-73

Gunawardena AHLAN, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE (2001) Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 212: 205-214

Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song XJ, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Mori H, Ashikari M (2009) The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460: 1026-1030

He CJ, Drew MC, Morgan PW (1994) Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* during hypoxia or nitrogen starvation. *Plant Physiol* 105: 861-865

He DJ, Finlayson SA, Drew MC, Jordan WR, Morgan PW (1996a) Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of maize subjected to mechanical impedance and hypoxia. *Plant Physiol* 112: 1679-1685

He CJ, Morgan PW, Drew MC (1996b) Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiol* 112: 463-472

Hedden P, Thomas SG (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* 444: 11-25

Hess N, Klode M, Anders M, Sauter M (2011) The hypoxia responsive transcription factor genes *ERF71/HRE2* and *ERF73/HRE1* of *Arabidopsis* are differentially regulated by ethylene. *Physiol Plant* 143: 41-49

Hinz M, Wilson IW, Yang J, Buerstenbinder K, Llewellyn D, Dennis ES, Sauter M, Dolferus R (2010) *Arabidopsis RAP2.2*: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiol* 153: 757-772

Hoffmann-Benning S, Kende H (1992) On the role of abscisic acid and gibberellin in the regulation of growth in rice. *Plant Physiol* 99: 1156-1161

Hua J, Meyerowitz EM (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261-271

Huang XS, Luo T, Fu XZ, Fan QJ, Liu JH (2011) Cloning and molecular characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from *Poncirus trifoliata* whose ectopic expression confers dehydration/drought tolerance in transgenic tobacco. *J Exp Bot* 62: 5191-5206

Huke RE (1982) Rice area by type of culture: south, southeast and east asia. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila, Phillipines

Hwang HJ, Kim JH, Eu YJ, Moon BY, Cho SH, Lee CH (2004) Photoinhibition of photosystem I is accelerated by dimethyldithiocarbamate, an inhibitor of superoxide dismutase, during light-chilling of spinach leaves. *J Photochem Photobiol B* 73: 79-85

Jackson MB (1985) Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. *Annu Rev Plant Physiol* 36: 145-174

Justin SHFW, Armstrong W (1991a) A reassessment of the influence of NAA on aerenchyma formation in maize roots. *New Phytol* 117: 607-618

Justin SHFW, Armstrong W (1991b) Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol* 118: 49-62

Kar RK (2011) Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. *Plant Signal Behav* 6: 1741-1745

Kato-Noguchi H, Morokuma M (2007) Ethanolic fermentation and anoxia tolerance in four rice cultivars. *J Plant Physiol* 164: 168-173

Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H (1998) Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* 204: 277-287

Kende H, van der Knaap E, Cho HT (1998) Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant Physiol* 118: 1105-1110

Kendrick MD, Chang C (2008) Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr Opin Plant Biol* 11: 479-485

Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441

Kim KH, Seo HS, Choi HS, Choi I, Shin YC, Ko SG (2011) Induction of apoptotic cell death by ursolic acid through mitochondrial death pathway and extrinsic death receptor pathway in MDA-MB-231 cells. *Arch Pharm Res* 34: 1363-1372

Konings H (1982) Ethylene-promoted formation of aerenchyma in seedling roots of *Zea mays* L. under aerated and non-aerated conditions. *Physiol Plant* 54: 119-124

Konings H, de Wolf A (1984) Promotion and inhibition by plant growth regulators of aerenchyma formation in seedling roots of *Zea mays*. *Physiol Plant* 60: 309-314

Korasick DA, Enders TA, Strader LC (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* 64: 2541-2555

Kristensen BK, Askerlund P, Bykova NV, Egsgaard H, Møller IM (2004) Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 65: 1839-1851

Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JDG, Schroeder JI (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 22: 2623-2633

Kwasniewski M, Chwialkowska K, Kwasniewska J, Kusak J, Siwinski K, Szarejko I (2013) Accumulation of peroxidase-related reactive oxygen species in trichoblasts correlates with root hair initiation in barley. *J Plant Physiol* 170: 185-195

Li Y, Qian Q, Zhou Y, Yan M, Sun L, Zhang M, Fu Z, Wang Y, Han B, Pang X, Chen M, Li J (2003) *BRITTLE CULM1*, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants. *Plant Cell* 15: 2020-2031

Licausi F, Kosmacz M, Weits DA, Giuntoli B, Giorgi FM, Voesenek LACJ, Perata P, van Dongen JT (2011) Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479: 419-422

Liesack W, Schnell S, Revsbech NP (2000) Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol Rev* 24: 625-645

Liu H, Wang S, Yu X, Yu J, He X, Zhang S, Shou H, Wu P (2005) *ARL1*, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J* 43: 47-56

López-Carbonell M, Gabasa M, Jáuregui O (2009) Enhanced determination of abscisic acid (ABA) and abscisic acid glucose ester (ABA-GE) in *Cistus albidus* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiol Biochem* 47: 256-261

Lorbiecke R, Sauter M (1998) Induction of cell growth and cell division in the intercalary meristem of submerged deepwater rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 204: 140-145

Lorbiecke R, Sauter M (1999) Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice. *Plant Physiol* 119: 21-29

Lord CEN, Wertman JN, Lane S, Gunawardena AHLAN (2011) Do mitochondria play a role in remodelling lace plant leaves during programmed cell death? *BMC Plant Biol* 11: 102

Love AJ, Milner JJ, Sadanandom A (2008) Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends Plant Sci* 13: 589-595

Lux DI (2010) Cytologische Untersuchungen der Aerenchymbildung in Reis (*Oryza sativa* L.). Bachelor-Arbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Mao C, Wang S, Jia Q, Wu P (2006) *OsEIL1*, a rice homolog of the *Arabidopsis EIN3* regulates the ethylene response as a positive component. *Plant Mol Biol* 61: 141-152

McSteen P (2010) Auxin and monocot development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001479

Mekhedov SL, Kende H (1996) Submergence enhances expression of a gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in deepwater rice. *Plant Cell Physiol* 37: 531-537

Métraux JP, Kende H (1983) The role of ethylene in the growth response of submerged deep water rice. *Plant Physiol* 72: 441-446

Millenaar FF, Cox MCH, van Berkel YEMdJ, Welschen RAM, Pierik R, Voesenek LACJ, Peeters AJM (2005) Ethylene-induced differential growth of petioles in *Arabidopsis*. Analyzing natural variation, response kinetics, and regulation. *Plant Physiol* 137: 998-1008

Mittler R, Simon L, Lam E (1997) Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J Cell Sci* 110: 1333-1344

Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, van Breusegem F (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 16: 300-309

Miyazaki JH, Yang SF (1987) Metabolism of 5-methylthioribose to methionine. *Plant Physiol* 84: 277-281

Møller IM (2001) PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 561-591

Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S (2009) Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 21: 2341-2356

Müller K, Carstens AC, Linkies A, Torres MA, Leubner-Metzger G (2009) The NADPH-oxidase *AtrbohB* plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening. *New Phytol* 184: 885-897

Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2007) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* 59: 501-520

Muthurajan R, Shobbar ZS, Jagadish SVK, Bruskiwich R, Ismail A, Leung H, Bennet J (2011) Physiological and proteomic responses of rice peduncles to drought stress. *Mol Biotechnol* 48: 173-182

Nakahara K, Tanimoto T, Hatano K, Usuda K, Shoun H (1993) Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J Biol Chem* 268: 8350-8355

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 140: 411-432

- Paciorek T, Friml J** (2006) Auxin signaling. *J Cell Sci* 119: 1199-1202
- Papini A, Mosti S, Brighigna L** (1999) Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma* 207: 213-221
- Parlanti S, Kudahettige NP, Lombardi L, Mensuali-Sodi A, Alpi A, Perata P, Pucciariello C** (2011) Distinct mechanisms for aerenchyma formation in leaf sheaths of rice genotypes displaying a quiescence or escape strategy for flooding tolerance. *Ann Bot* 107: 1335-1343
- Pedersen O, Rich SM, Colmer TD** (2009) Surviving floods: leaf gas films improve O₂ and CO₂ exchange, root aeration, and growth of completely submerged rice. *Plant J* 58: 147-156
- Perfus-Barbeoch L, Jones AM, Assmann SM** (2004) Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. *Curr Opin Plant Biol* 7: 719-731
- Pierik R, van Aken JM, Voesenek LACJ** (2009) Is elongation-induced leaf emergence beneficial for submerged *Rumex* species? *Ann Bot* 103: 353-357
- Poneleit LS, Dilley DR** (1993) Carbon dioxide activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase in ethylene biosynthesis. *Postharvest Biol Technol* 3: 191-199
- Potocký M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnov N, Žárský V** (2007) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol* 174: 742-751
- Pucciariello C, Banti V, Perata P** (2012a) ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses. *Plant Physiol Biochem* 59: 3-10

Pucciariello C, Parlanti S, Banti V, Novi G, Perata P (2012b) Reactive oxygen species-driven transcription in *Arabidopsis* under oxygen deprivation. *Plant Physiol* 159: 184-196

Purnobasuki H, Suzuki M (2005) Aerenchyma tissue development and gas-pathway structure in root of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *J Plant Res* 118: 285-294

Qi Y, Wang H, Zou Y, Liu C, Liu Y, Wang Y, Zhang W (2011) Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *FEBS Lett* 585: 231-239

Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15: 395-401

Raskin I, Kende H (1984a) Regulation of growth in stem sections of deep-water rice. *Planta* 160: 66-72

Raskin I, Kende H (1984b) Role of gibberellin in the growth response of submerged deep water rice. *Plant Physiol* 76: 947-950

Raskin I, Kende H (1985) Mechanism of aeration in rice. *Science* 228: 327-329

Reape TJ, McCabe PF (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol* 180: 13-26

Reape TJ, Molony EM, McCabe PF (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J Exp Bot* 59: 435-444

Ren H, Gao Z, Chen L, Wei K, Liu J, Fan Y, Davies WJ, Jia W, Zhang J (2007) Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water deficit. *J Exp Bot* 58: 211-219

Rogers HJ (2005) Cell death and organ development in plants. *Curr Top Dev Biol* 71: 225-261

Rubery PH, Sheldrake AR (1973) Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. *Nat New Biol* 244: 285-288

Rzewuski G, Sauter M (2008) Ethylene biosynthesis and signaling in rice. *Plant Sci* 175: 32-42

Saika H, Okamoto M, Miyoshi K, Kushiro T, Shinoda S, Jikumaru Y, Fujimoto M, Arikawa T, Takahashi H, Ando M, Arimura S, Miyao A, Hirochika H, Kamiya Y, Tsutsumi N, Nambara E, Nakazono M (2007) Ethylene promotes submergence-induced expression of OsABA8ox1, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. *Plant Cell Physiol* 48: 287-298

Sauter A, Davies WJ, Hartung W (2001) The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *J Exp Bot* 52: 1991-1997

Sauter M, Kende H (1992) Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Planta* 188: 362-368

Schlüter UB, Furch B, Joly CA (1993) Physiological and anatomical adaptations by young *Astrocaryum jauari* Mart. (Arecaceae) in periodically inundated biotopes of Central Amazonia. *Biotropica* 25: 384-396

Schwechheimer C (2008) Understanding gibberellic acid signaling – are we there yet? *Curr Opin Plant Biol* 11: 9-15

Simeonova E, Garstka M, Koziol-Lipińska J, Mostowska A (2004) Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll leaf senescence. *Protoplasma* 223: 143-153

Smalle J, van der Straeten D (1997) Ethylene and vegetative development. *Physiol Plant* 100: 593-605

Steffens B, Geske T, Sauter M (2011) Aerenchyma formation in the rice stem and its promotion by H₂O₂. *New Phytol* 190: 369-378

Steffens B, Kovalev A, Gorb SN, Sauter S (2012) Emerging roots alter epidermal cell fate through mechanical and reactive oxygen signaling. *Plant Cell* 24: 3296-3306

Steffens B, Sauter M (2009a) Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H₂O₂ through an autoamplified signal pathway. *Plant Cell* 21: 184-196

Steffens B, Sauter M (2009b) Heterotrimeric G protein signaling is required for epidermal cell death in rice. *Plant Physiol* 151: 732-740

Steffens B, Steffen-Heins A, Sauter M (2013) Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. *Front Plant Sci* 4: 179

Steffens B, Wang J, Sauter M (2006) Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. *Planta* 223: 604-612

Striker GG, Insausti P, Grimoldi AA, Vega AS (2007) Trade-off between root porosity and mechanical strength in species with different types of aerenchyma. *Plant Cell Environ* 30: 580-589

Stünzi JT, Kende H (1989) Gas composition in the internal air spaces of deepwater rice in relation to growth induced by submergence. *Plant Cell Phys* 30: 49-56

Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol* 14: 691-699

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208

Teakle NL, Armstrong J, Barrett-Lennard EG, Colmer TD (2011) Aerenchymatous phellem in hypocotyl and roots enables O₂ transport in *Melilotus siculus*. *New Phytol* 190: 340-350

Temple BRS, Jones AM (2007) The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annu Rev Plant Biol* 58: 249-266

Trough MCT, Drew MC (1980) The development of waterlogging damage in young wheat plants in anaerobic solution cultures. *J Exp Bot* 31: 1573-1585

van der Weele CM, Canny MJ, McCully ME (1996) Water in aerenchyma spaces in roots. A fast diffusion path for solutes. *Plant Soil* 184: 131-141

van Doorn WG (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J Exp Bot* 62: 4749-4761

van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LAJ, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ* 18: 1241-1246

van Gestel K, Verbelen JP (2002) Giant mitochondria are a response to low oxygen pressure in cells of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *J Exp Bot* 53: 1215-1218

van Ginkel PR, Darjatmoko SR, Sareen D, Subramanian L, Bhattacharya S, Lindstrom MJ, Albert DM, Polans AS (2008) Resveratrol inhibits uveal melanoma tumor growth via early mitochondrial dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 1299-1306

Vanneste S, Friml J (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136: 1005-1016

Verboven P, Pedersen O, Herremans E, Ho QT, Nicolai BM, Colmer TD, Teakle N (2012) Root aeration via aerenchymatous phellem: three-dimensional micro-imaging and radial O₂ profiles in *Melilotus siculus*. *New Phytol* 193: 420-431

Vieten A, Vanneste S, Wiśniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132: 4521-4531

Visser EJW, Bögemann GM (2003) Measurement of porosity in very small samples of plant tissue. *Plant Soil* 253: 81-90

Visser EJW, Bögemann GM (2006) Aerenchyma formation in the wetland plant *Juncus effusus* is independent of ethylene. *New Phytol* 171: 305-314

Voesenek LACJ, Bailey-Serres J (2009) Genetics of high-rise rice. *Nature* 460: 959-960

Voesenek LACJ, Benschop JJ, Bou J, Cox MCH, Groeneveld HW, Millenaar FF, Vreeburg RAM, Peeters AJM (2003) Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Ann Bot* 91: 205-211

Voesenek LACJ, Colmer TD, Pierik R, Millenaar FF, Peeters AJ (2006) How plants cope with complete submergence. *New Phytol* 170: 213-226

Wang W, Esch JJ, Shiu SH, Agula H, Binder BM, Chang C, Patterson SE, Bleecker AB (2006) Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3429-3442

Watanabe H, Saigusa M, Hase S, Hayakawa T, Satoh S (2004) Cloning of a cDNA encoding an ETR2-like protein (Os-ERL1) from deep water rice (*Oryza sativa* L.) and increase in its mRNA level by submergence, ethylene, and gibberellin treatments. *J Exp Bot* 55: 1145-1148

Webb T, Armstrong W (1983) The effects of anoxia and carbohydrates on the growth and viability of rice, pea and pumpkin roots. *J Exp Bot* 34: 579-603

Wignarajah K, Greenway H, John CD (1976) Effect of waterlogging on growth and activity of alcohol dehydrogenase in barley and rice. *New Phytol* 77: 585-592

Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K (2004) Down-Regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol* 135: 1447-1456

Xie Y, Wu R (1989) Rice alcohol dehydrogenase genes: anaerobic induction, organ specific expression and characterization of cDNA clones. *Plant Mol Biol* 13: 53-68

Xiong L, Zhu JK (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 133: 29-36

Yamauchi T, Rahji I, Nakazono M (2011) Lysigenous aerenchyma formation in maize root is confined to cortical cells by regulation of genes related to generation and scavenging of reactive oxygen species. *Plant Signal Behav* 6: 759-761

Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 155-189

Yang X, Li Y, Ren B, Ding L, Gao C, Shen Q, Guo S (2012) Drought-induced root aerenchyma formation restricts water uptake in rice seedlings supplied with nitrate. *Plant Cell Physiol* 53: 495-504

Yang Z, Wu Y, Li Y, Ling HQ, Chu C (2009) OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 70: 219-229

Yao N, Eisfelder BJ, Marvin J, Greenberg JT (2004) The mitochondrion - an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 40: 596-610

Yau CP, Wang L, Yu M, Zee SY, Yip WK (2004) Differential expression of three genes encoding an ethylene receptor in rice during development, and in response to indole-3-acetic acid and silver ions. *J Exp Bot* 55: 547-556

Ye N, Zhu G, Liu Y, Li Y, Zhang J (2011) ABA controls H₂O₂ accumulation through the induction of *OsCATB* in rice leaves under water stress. *Plant Cell Physiol* 52: 689-698

Yoo SD, Cho Y, Sheen J (2009) Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci* 14: 270-279

Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature* 451: 789-795

Young TE, Gallie DR (1999) Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Mol Biol* 39: 915-926

Zarembinski TI, Theologis A (1993) Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Biol Cell* 4: 363-373

Zhu G, Ye N, Zhang J (2009) Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 50: 644-651

Zhu J, Brown KM, Lynch JP (2010) Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Environ* 33: 740-749

Zhu T, Rost TL (2000) Directional cell-to-cell communication in the *Arabidopsis* root apical meristem III. Plasmodesmata turnover and apoptosis in meristem and root cap cells during four weeks after germination. *Protoplasma* 213: 99-107

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Charakterisierung der Aerenchymbildung in Internodien von Reis (*Oryza sativa* L.)“, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin Frau PD Dr. Bianka Steffens, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Dissertation wurde an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Teile der Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Steffens B, Geske T, Sauter M (2011) Aerenchyma formation in the rice stem and its promotion by H₂O₂. *New Phytol* 190: 369-378

Kiel, den

Thomas Geske

Danksagung

Zunächst einmal danke ich meiner Doktormutter Frau PD Dr. Bianka Steffens für die Unterstützung, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die fachlichen Diskussionen und das stets offene Ohr, das sie mir während der gesamten Doktorarbeit lieh.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. Margret Sauter für die herzliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe, die konstruktive Kritik sowie die kompetenten Ratschläge zu meiner Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Laborkollegen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die ständige Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich meiner geliebten Frau Angelika Wöhler-Geske, meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer für mich da waren und mich zu jeder Zeit ermutigt und unterstützt haben. Besonderer Dank geht hierbei an Stefan Ulbricht, der mir während der gesamten Arbeit immer den Rücken freihielt.

Schließlich danke ich Marcus Fenix, Dominic Santiago († 2011) sowie Solaire of Astora, die mich große Teile meiner Arbeit begleitet und mich immer unterstützt haben.

Danke!

Lebenslauf

Thomas Geske

Persönliche Daten

Geburtstag: 24.11.1981
Geburtsort: Frankfurt (Oder)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1988 – 09/1994 8. Grundschule, Frankfurt (Oder)
09/1994 – 06/2001 Carl-Friedrich-Gauß-Gymnasium, Frankfurt (Oder)
22.06.2001 Abschluss Abitur

Hochschulausbildung

10/2002 – 03/2009 Biochemiestudium an der Universität Potsdam mit Biochemie als Hauptfach und Molekularbiologie, Physikalische Chemie sowie Mikrobiologie als Nebenfächer

02/2007 – 04/2008 Diplomarbeit mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung des Glucosylceramid-Synthase-ähnlichen Gens in dem Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens*“ am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Dörmann

31.03.2009 Abschluss Diplom-Biochemiker

10/2009 – 09/2013 Promotionsstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel