

Regulation der osmotischen
Stressantwort durch den
Phytosulfokinsignalweg in
unterschiedlichen Entwicklungsstadien
von Arabidopsis

Dissertation

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

vorgelegt von
Martina Diana Schönhof
aus Reinbek

Kiel
2019

Erste/r Gutachter/in:

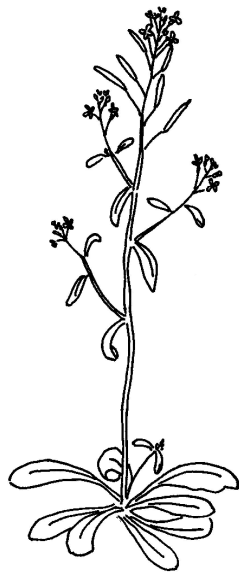
Prof. Dr. Margret Sauter

Zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Dietrich Ober

Tag der mündlichen Prüfung:

30.08.2019



„[...] das Glück ist eine kleine Pflanze [...]“

Robert Walser

Inhalt

Inhalt.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	1
Abstract.....	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Signalleitung in Pflanzen	3
1.2 Peptidhormone - Peptide mit Signalwirkung.....	4
1.3 Das Peptidhormon Phytosulfokin	5
1.4 Austrocknung und osmotischer Stress	9
1.5 Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA)	11
1.6 Transkriptionsfaktoren in Arabidopsis.....	14
1.7 Zielsetzung der Arbeit	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	17
2.1.2 Medien und Reagenzien	17
2.1.3 Größenstandards	17
2.1.4 Primer	17
2.1.5 Vektoren	18
2.1.6 Mikroorganismen	18
2.1.7 Pflanzenmaterial.....	18
2.1.8 Mikroskope und bildgebende Geräte.....	19
2.1.9 Programme zur computergestützten Sequenzanalyse und statistischen Auswertung	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	21
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	24
2.2.3 Arbeiten mit Pflanzenmaterial	32
2.2.4 Physiologische Versuchsmethoden	34
2.2.5 Anfertigung von Präparaten zur Mikroskopie	35
3 Ergebnisse	37
3.1 Der PSK-Signalweg reguliert den ABA-Metabolismus und verstärkt die osmotische Stressresistenz	37
3.1.1 PSKR1 unterstützt das Sprosswachstum bei osmotischem Stress	37
3.1.2 <i>PSKR1</i> -Expressionsinduktion bei osmotischem Stress	39

3.1.3	Die PSK-Genexpression wird durch osmotischen Stress und die PSK-Rezeptoren reguliert	44
3.1.4	Die ABA-abhängige und -unabhängige Stressantwort als mögliche Ursache für eine PSK-vermittelte osmotische Stressresistenz	47
3.1.5	Der PSK-Signalweg reguliert den ABA-Metabolismus	52
3.1.6	Die PSK-Rezeptoren verstärken die durch ABA und Mannitol verursachte Inhibierung der frühen Keimlingsentwicklung	59
3.1.7	Der PSK-Signalweg begünstigt die Lateralwurzelentwicklung bei osmotischem Stress	64
3.2	Phytosulfokin reguliert die Aktivität von Transkriptionsfaktor- und entwicklungsspezifischen Genen	68
3.2.1	PSK hat einen überwiegend inhibierenden Effekt auf die Expression von Transkriptionsfaktor genen	68
3.2.2	PSK-regulierte Transkriptionsfaktoren gehören zu unterschiedlichen Transkriptionsfaktor familien und erfüllen unterschiedliche Funktionen	70
3.2.3	Funktionsanalyse PSK-regulierter Transkriptionsfaktoren bezüglich des Primärwurzelwachstums	71
3.2.4	PSK-regulierte entwicklungsspezifische Gene	98
3.2.5	PSK-regulierte Gene zeigen unterschiedliche Einflüsse auf die Primärwurzelelongation	105
3.3	PSK-regulierte Gene werden durch osmotischen Stress reguliert	107
3.4	PSK-regulierte Gene können in der osmotischen Stressantwort wirken	108
3.4.1	RAP2.3 reguliert nicht das Sprosswachstum bei mäßigem osmotischem Stress	109
3.4.2	HB24 bewirkt eine Reduktion des Sprossfrischgewichts bei osmotischem Stress	110
3.4.3	bHLH129 bewirkt eine Reduktion des Sprossfrischgewichts	111
3.4.4	AGL17 und AGL21 regulieren nicht das Sprosswachstum bei osmotischem Stress	112
3.4.5	BNQ3 inhibiert das Sprosswachstum, verstärkt durch osmotischen Stress ...	113
4	Diskussion	114
4.1	PSKR1-Signalwirkung unterstützt die osmotische Stressresistenz	114
4.2	<i>PSKR1</i> - und <i>PSK</i> -Gene werden durch osmotischen Stress und ABA in jungen Sprossgeweben induziert	115
4.3	PSKR-Signalwirkung reguliert den ABA-Metabolismus im Spross unter osmotischem Stress	116
4.4	PSKR-Signalweg beeinflusst weitere ABA-abhängige und durch osmotischen Stress beeinflusste Entwicklungsprozesse	118
4.5	Ethylen als möglicher Antagonist zu ABA-/PSK-regulierten Prozessen	120

4.6	PSK-Signalweg wirkt inhibierend auf die Expression von Transkriptionsfaktorgenen 122	
4.7	PSK-induzierte Transkriptionsfaktoren fördern das Wurzelwachstum	124
4.8	Ausblick	124
5	Literatur	126
Anhang		166
	zu Kapitel 3.1.1	180
	zu Kapitel 3.1.2	181
	zu Kapitel 3.1.4	182
	zu Kapitel 3.1.6	183
	zu Kapitel 3.1.7	187
	zu Kapitel 3.2	188
	MADS-Box Transkriptionsfaktoren	188
	Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren	190
	Transkriptionsfaktoren mit ZF-Motiv	192
	NAC-Domänentranskriptionsfaktoren	195
	AP2/EREBP-Transkriptionsfaktoren	197
	MYB-Domänentranskriptionsfaktoren	200
	bHLH-Proteine	201
	OSR-Proteinfamilie	203
	zu Kapitel 3.2.1	206
	zu Kapitel 3.2.2	208
	zu Kapitel 3.2.3	210
	zu Kapitel 3.2.4	211
	zu Kapitel 4.4	212
Eidesstattliche Erklärung		213
Danksagung		214

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ABA2	<i>ABA DEFICIENT 2</i>
ABA-GE	ABA-Glucoseester
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
<i>ABI1, -3</i>	<i>ABA INSENSITIVE 1, -3</i>
ad	auffüllen bis
<i>AGL17, -21</i>	<i>AGAMOUS-LIKE 17, -21</i>
<i>AHA1, -2</i>	<i>H(+)-ATPASE 1, -2</i>
AP2/EREBP	<i>APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN</i>
ARF	<i>AUXIN RESPONSE FACTOR</i>
ARGOS	<i>AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE</i>
ARL	<i>ARL-LIKE</i>
<i>AtML1</i>	<i>Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>BAK1</i>	<i>BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1</i>
BG	β -Glucosidase
<i>BG1, -2</i>	<i>Arabidopsis thaliana BETA-GLUCOSIDASE 1, -2</i>
bHLH	<i>basic HELIX-LOOP-HELIX</i>
<i>bHLH129</i>	<i>basic HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 129</i>
<i>BNQ3</i>	<i>BANQUO 3</i>
bp	Basenpaare
<i>BRI1</i>	<i>BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1</i>
bZIP	<i>basic leucine zipper</i>
CaM	Calmodulin
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
<i>CNGC17</i>	<i>CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 17</i>
CP	<i>crossing point</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
<i>CYP707A1 - 4</i>	<i>CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1, -2, -3, -4</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOF	<i>DNA BINDING WITH ONE FINGER</i>
<i>DOF1.2</i>	<i>DNA-BINDING WITH ONE FINGER DOMAIN PROTEIN 1.2</i>
DPA	Dihydrophaseinsäure
<i>DREB2A</i>	<i>DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING 2A</i>
DREB	<i>dehydration-responsive element-binding</i>
DRE	<i>dehydration-responsive element</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum

<i>ERF104</i>	<i>ETHYLENE RESPONSE FACTOR 104</i>
<i>ESE3</i>	<i>ETHYLENE AND SALT INDUCIBLE 3</i>
<i>et al.</i>	und andere
ff.	folgende
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>GAZ</i>	<i>GA- AND ABA-RESPONSIVE ZINC FINGER</i>
<i>GC</i>	Guanylatzyklase
<i>gDNA</i>	genomische DNA
<i>GUS</i>	β-Glucoronidase
<i>HB</i>	Homöobox
<i>HB24</i>	<i>HOMEBOX PROTEIN 24</i>
kb	Kilobasenpaare
<i>LB</i>	Medium nach Luria-Bertani
<i>LRR-RLK</i>	<i>leucine rich repeat receptor-like protein kinase</i>
<i>MADS</i>	<i>MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1, AGAMOUS, DEFICIENS, and SERUM RESPONSE FACTOR</i>
<i>MAP</i>	<i>mitogen activated protein</i>
<i>Mbp</i>	Megabasenpaaren
<i>MOPS</i>	(N-morpholino)-propansulfonsäure
<i>mRNA</i>	<i>messenger RNA</i>
<i>MS</i>	Murashige & Skoog
<i>MYB88</i>	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 88</i>
n.s.	nicht signifikant
<i>NAC</i>	<i>NO APICAL MERISTEM, Arabidopsis TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR 1/2, and CUP-SHAPED COTYLEDON 2</i>
<i>NAC015, -031, -068, -070</i>	<i>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 15, -31, -68, -70</i>
<i>NCED</i>	9'-cis-Epoxycarotinoiddioxygenase
<i>NCED3, -5, -9</i>	<i>NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3, -5, -9</i>
<i>OD</i>	optische Dichte
<i>OSR</i>	<i>organ size related</i>
<i>OST1</i>	<i>OPEN STOMATA 1</i>
<i>PA</i>	Phaseinsäure
<i>PAMPs</i>	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
<i>PCR</i>	Polymerasekettenreaktion
<i>PDF2</i>	<i>PROTODERMAL FACTOR 2</i>
<i>PP2C</i>	<i>PROTEIN PHOSPHATASE 2C</i>
<i>PSK</i>	Phytosulfokin
<i>PSK1, -2, -3, -4, -5</i>	<i>PHYTOSULFOKINE 1 (-2, -3, -4, -5) PRECURSOR</i>
<i>PSKR1, -2</i>	<i>PSK-RECEPTOR 1, -2</i>
<i>PSY1</i>	<i>PLANT PEPTIDE CONTAINING SULFATED TYROSINE 1</i>
<i>PTI</i>	<i>pattern-triggered immunity</i>
<i>PYL6</i>	<i>PYRABACTIN RESISTANCE 1-LIKE 6</i>

PYR/PYL/RCAR	<i>PYRABACTIN RESISTANCE 1/PYR-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR</i>
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
<i>RAP2.3, -2.12</i>	<i>RELATED TO AP2 3, -12</i>
<i>RCPG</i>	<i>ROOT CAP POLYGALACTURONASE</i>
<i>RGF1</i>	<i>ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR 1</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
<i>SBT1.1</i>	<i>SUBTILASE 1.1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
<i>SMB</i>	<i>SOMBRERO</i>
SnRK2	<i>SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASES 2</i>
<i>SNRK2.9</i>	<i>SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2.9</i>
<i>STZ</i>	<i>SALT TOLERANCE ZINC FINGER</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TfB I	<i>Transformation buffer I</i>
T _M	Schmelztemperatur
<i>TPST</i>	<i>TYROSYLPROTEIN SULFOTRANSFERASE</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten (<i>units</i>)
<i>UGT71B6, -B7, -B8, -C5</i>	<i>UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 71B6, -B7, -B8, -C5</i>
UGT	Uridindiphosphatglucosyltransferase
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
<i>WRKY48</i>	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 48</i>
wt	Wildtyp
X-Gluc	Cyclohexylammoniumsalz der 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronsäure
YEP	<i>yeast extract peptone</i>

Zusammenfassung

Das sulfatierte Peptidhormon Phytosulfokin (PSK) fördert das Spross- und Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana*. In der Pflanze kodieren fünf Gene, *PSK1* - *PSK5*, für PSK-Vorläuferproteine. Der Wachstumsfaktor wird durch zwei Rezeptoren, *PSKR1* und *PSKR2*, perzipiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Sprosswachstum bei osmotischem Stress durch die Signalvermittlung über *PSKR1* unterstützt wird. Osmotischer Stress führt zur Induktion der Genexpression von *PSKR1* und des PSK-Vorläufers *PSK3*. Diese Art von Stress wirkt zum Teil über Abscisinsäure (ABA), die die Expression von *PSKR1* und *PSK2* - *PSK4* induziert. Analysen mit *PSKR-knockout*-Mutanten zeigten, dass der PSK-Signalweg für die Akkumulation von ABA im Spross erforderlich ist. Bei osmotischem Stress unterdrückt er die Glykosylierung von ABA durch Inhibierung des UDP-Glucosyltransferasesgens *UGT71B6* und dadurch die ABA-Inaktivierung. Zusätzlich wird die Freisetzung von glucosegebundenem ABA über Hydrolyse durch Induktion des β -Glucosidasegens *BG1* induziert. Dies führt zu einem Anstieg von freiem ABA bei osmotischem Stress. Die Regulation von Entwicklungsprozessen bei osmotischem Stress und in Antwort auf ABA durch den PSK-Signalweg zeigt sich auch in der frühen Keimlingsentwicklung. Die ABA-induzierte Verzögerung des Ergrünerens der Kotyledonen nach der Keimung wird durch den PSK-Signalweg verstärkt. Dagegen wird in einem späteren Entwicklungsstadium der Pflanze die Penetration und die Elongation von Lateralwurzeln gefördert, während ABA die Elongation hemmt. Dies zeigt, dass der PSK-Signalweg die Entwicklung des Sprosses bei osmotischem Stress durch Freisetzung von ABA fördert, in der Wurzel jedoch ein anderer Regulationsmechanismus wirkt.

Microarraydaten zeigten, dass in Antwort auf PSK die Expression von 16 Transkriptionsfaktorgenen (TF-Genen) in der Wurzel reguliert wird. Die Genaktivität dieser TFs wurde überwiegend durch den PSK-Signalweg inhibiert. Es handelt sich um Mitglieder von sieben verschiedenen TF-Familien, die sowohl Entwicklungsprozesse als auch, in den meisten Fällen, Stressantworten regulieren. Wachstumsanalysen an Überexpressions- und T-DNA-Insertionslinien von 14 dieser Gene zeigten, dass das Wurzelwachstum durch sechs dieser TFs induziert wird, durch zwei reprimiert und dass sechs keinen Einfluss auf das Wachstum der Wurzel haben. Die durch PSK induzierten TF-Gene *AGL17*, *AGL21* und *MYB88* förderten das Wurzelwachstum. Eine Überexpression und/oder ein *knockout* von *PDF2*, *bHLH129*, *NAC068* und *AGL17* zusammen mit *AGL21* bewirkte eine Unterdrückung der PSK-vermittelten Wurzelelongation. Keine dieser Linien zeigte jedoch eine Reduktion des Wurzelwachstums, wie es bei einem *knockout* der PSK-Rezeptoren zu beobachten ist. Somit konnte kein zentraler Regulator der PSK-vermittelten Wurzelelongation identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Funktion der identifizierten TFs durch redundante Proteine kompensiert werden kann und der untersuchte Wachstumsprozess durch ein komplexes Signalleitungsnetzwerk reguliert wird.

Abstract

The sulfated peptide hormone phytosulfokine (PSK) enhances shoot and root growth of *Arabidopsis thaliana*. PSK-precursor proteins are encoded by five genes, *PSK1* - *PSK5*. The growth factor is perceived by the two receptors PSKR1 and PSKR2. It could be shown here that the shoot growth is maintained by PSKR1-signaling during osmotic stress. Osmotic stress caused an induction of the gene expression of *PSKR1* and the PSK-precursor *PSK3*. Osmotic stress is partially transmitted by abscisic acid (ABA) which induced the expression of *PSKR1* and *PSK2* - *PSK4*. Analyses of PSKR-knockout mutants showed that PSK-signaling is needed for the accumulation of ABA in the shoot. During osmotic stress, it represses the glycosylation, and hence activation of ABA by inhibiting the UDP-glucosyltransferase *UGT71B6*. Additionally the hydrolysis-driven release of glucose-bound ABA is induced by the induction of the β -glucosidase gene *BG1*. This leads to an increase of free ABA during osmotic stress. The regulation of developmental processes during osmotic stress and in response to ABA through the PSK-signaling pathway was observed in the early seedling development. The ABA-induced inhibition of cotyledon greening after germination is enhanced by PSK-signaling. At a later developmental stage, the outgrowth and elongation of lateral roots is supported by PSK-signaling which is contrary to the effect of ABA on lateral root elongation. This shows that the PSK-signaling pathway promotes the shoot development during osmotic stress by ABA-release whereas another regulatory mechanism exists in the root.

Microarray data showed a regulation of expression of 16 transcription factor (TF) genes in response to PSK in the root. The gene activity of these TFs was predominantly repressed by the PSK-signaling pathway. The identified TF proteins belong to seven different TF-families and regulate developmental processes as well as, in most cases, stress responses. Growth analyses of overexpression and T-DNA insertion lines of 14 of these genes showed a root growth induction by six TFs, a repression by two TFs and six did not affect the root elongation. The PSK-induced TF genes *AGL17*, *AGL21*, and *MYB88* promoted root growth. Overexpression and/or knockout of *PDF2*, *bHLH129*, *NAC068*, and *AGL17* together with *AGL21* caused an inhibition of PSK-mediated root elongation. But none of these lines showed a reduction of root growth as seen in PSKR-knockout lines. Hence no central regulator of PSK-mediated root growth could be identified. This suggests that the function of the identified TFs might be compensated by redundant proteins and the growth process is regulated by a complex signaling network.

1 Einleitung

Die Entwicklung multizellulärer Organismen erfordert eine präzise Koordination von Signalen und deren Weiterleitung. Aufgrund ihrer sessilen Lebensform, der Abwesenheit von Zellmobilität und dem Vorhandensein starrer Zellwände ist für Pflanzen eine ausgeprägte innerorganismische Kommunikation essentiell, um auf innere und insbesondere äußere Reize reagieren zu können. Ein wichtiger Bestandteil dieser Kommunikation sind Phytohormone, die nicht nur die Entwicklung der Pflanze regulieren, sondern ebenso Reaktionen der Pflanze auf biotische Reize und abiotischen Stress vermitteln. Eines dieser Phytohormone ist das Peptidhormon Phytosulfokin (PSK), das sowohl das pflanzliche Wachstum fördert als auch die Reaktion auf biotische Stimuli beeinflusst (Sauter, 2015).

1.1 Signalleitung in Pflanzen

In Pflanzen gibt es verschiedene Wege der Signalweiterleitung, die interagieren. Es gibt Langstreckensignale, die über den gesamten Kormus verbreitet werden können und Kurzstreckensignale, die einen Signalaustausch auf Zell-Zell-Ebene erlauben. Langstreckensignale bieten die Möglichkeit einer schnellen Reizweiterleitung und somit direkten Reaktion insbesondere auf äußere Einflüsse. Für entwicklungsbiologische Prozesse wie die Organogenese spielen Positionssignale, insbesondere auf kurzer Übertragungsstrecke, eine entscheidende Rolle. Die interzelluläre Kommunikation ist in Pflanzen weitaus besser untersucht als die Kommunikation über den Langstreckentransportweg. Alle bekannten Prozesse der Kurzstreckensignalleitung finden durch Austausch chemischer Stoffe statt. Kurzstreckensignale können durch symplastischen Transport übertragen werden, bei dem eine direkte Zell-Zell-Kommunikation durch Plasmodesmata stattfindet (Busch & Benfey, 2010; Wu & Gallagher, 2011; Sevillem *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2014). Eine weitere Möglichkeit der Signalweiterleitung findet durch Diffusion oder Sekretion von Signalstoffen in den Apoplast und deren Import in benachbarte Zellen oder ihre Erkennung an membrangebundenen Rezeptorproteinen statt (Rojo *et al.*, 2002; Robert & Friml, 2009; Murphy *et al.*, 2012; Lacey *et al.*, 2017). Als Kurzstreckensignale waren zunächst vor allem lipophile Phytohormone, insbesondere Auxin, bekannt (Goldsmith, 1977; Petrášek & Friml, 2009; Lacey *et al.*, 2017). In den letzten Jahrzehnten wurden weitere wie Brassinosteroide, Jasmonat, Salicylsäure und Strigolactone beschrieben (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). Die Vielfalt der bekannten Signalstoffe hat sich zusätzlich um Peptidhormone (Lindsey *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2012) und Moleküle erweitert, die nicht den Charakter eines Hormons innehaben. Zu diesen gehören kleine RNAs und mobile Transkriptionsfaktoren (TFs) (Van Norman *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2015; Pyott & Molnar, 2015).

1.2 Peptidhormone - Peptide mit Signalwirkung

Die Entdeckung von Systemin (Ryan, 1974), das in *Solanum lycopersicum* L. (Tomate) bei Verwundung freigesetzt wird und die pflanzliche Abwehr aktiviert (Ryan, 2000; Sun *et al.*, 2011), und die Erkenntnis, dass es sich bei diesem Faktor um ein Peptid mit Signalwirkung handelt (Pearce *et al.*, 1991), ebneten den Weg für die Erforschung von Peptidhormonen in Pflanzen. Inzwischen sind, zusätzlich zu Systemin und seiner Aktion in Abwehrmechanismen, einige andere Peptide beschrieben worden, die in entwicklungsbiologischen Prozessen wirken. Diese umfassen den Erhalt der meristematischen Aktivität (Fletcher *et al.*, 1999; Matsuzaki *et al.*, 2010), die Zelldifferenzierung (Shimada *et al.*, 2011), -proliferation (Amano *et al.*, 2007) und -elongation (Matsubayashi & Sakagami, 1996; Pearce *et al.*, 2001; Amano *et al.*, 2007), die florale Organabszission (Butenko *et al.*, 2003) sowie den Gravitropismus (Whitford *et al.*, 2012).

Die pflanzlichen Peptidhormone werden aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung in drei Klassen eingeteilt, cysteinreiche und cysteinarme sowie einen intermediären Typ (Matsubayashi, 2011a). Einem Großteil gemein ist, dass ihre Gene für biologisch inaktive Präpropeptide kodieren, die eine Signalsequenz für einen Import in den sekretorischen Weg enthalten. Das erste Reifesignal für die Peptide ist das co-translationale Abspalten der Signalsequenz beim Import in das endoplasmatische Retikulum (ER) (Matsubayashi, 2011a, 2011b). Das so entstandene Propeptid erfährt weitere posttranslationale Modifikationen (Matsubayashi, 2011a). Die Propeptide der cysteinarmen Peptidhormone können verschiedene Modifikationen aufweisen. Zu diesen gehören die Tyrosinsulfatierung, Prolinhydroxylierung oder Hydroxyprolinarabinylierung. Zusätzlich wird die bis zu 20 Aminosäuren lange finale Peptidsequenz proteolytisch aus dem Propeptid gespalten. In den cysteinreichen Propeptiden werden Disulfidbrückenbindungen ausgebildet, die ohne eine weitere Spaltung zur Reife des Peptids führen. Die intermediäre Form bildet Disulfidbrückenbindungen aus und erfährt eine Prozessierung zur Freisetzung des reifen Peptids. Die Prozessierungen finden höchstwahrscheinlich nach einer Sekretion im apoplastischen Raum statt und nicht wie in Tieren in proteolytischen Vesikeln (Hook *et al.*, 2008; Djordjevic *et al.*, 2011; Ni *et al.*, 2011). Diese posttranslationalen Modifikationen und Prozessierungen beeinflussen die Bindungsaffinität und Aktivierung für die zugehörigen Rezeptoren (Ogawa *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015b; Song *et al.*, 2016).

Die Perzeption und die Weiterleitung des von Peptidhormonen vermittelten Signals geschieht nach bisherigen Erkenntnissen vor allem durch plasmamembranlokalisierte Rezeptoren des LRR-RLK-Typs (*leucine rich repeat receptor-like protein kinase*) (Matsubayashi *et al.*, 2002; Hirakawa *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2008; Uchida *et al.*, 2012). Durch die Bindung des jeweiligen Liganden werden die Rezeptoren aktiviert und setzen die Regulation des intrazellulären Signalnetzwerkes in Gang. Dies geschieht zum Beispiel durch Phosphorylierung von Proteinen, was Phosphorylierungskaskaden und/oder eine direkte Antwort hervorrufen und zu einer Transkriptionsregulation spezifischer Gene führen kann.

1.3 Das Peptidhormon Phytosulfokin

Phytosulfokin gehört zu den pflanzenspezifischen, cysteinarmen Peptidhormonen und ist für seinen wachstums- und differenzierungsfördernden Effekt in unterschiedlichen Pflanzenarten bekannt (Yamakawa *et al.*, 1998; Matsubayashi *et al.*, 1999b; Kutschmar *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2014). Ein erster Nachweis des Peptidhormons gelang in Protoplastenkulturen von *Asparagus officinalis* L. (Gemüsespargel) in einem konditionierten Medium (Matsubayashi & Sakagami, 1996). In einer Zellkultur mit geringer Dichte wurde Zellproliferation durch einen unbekanntem Faktor eines Mediums sich schnell teilender Zellen induziert. Der proliferationsfördernde Effekt des Mediums konnte durch Zugabe damaliger bekannter Pflanzenhormone nicht imitiert werden. Das für diesen Effekt verantwortliche Peptid PSK- α wurde isoliert und als disulfatiertes Pentapeptid mit der Sequenz H-Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln-OH (YsIYsTQ) identifiziert (Matsubayashi & Sakagami, 1996).

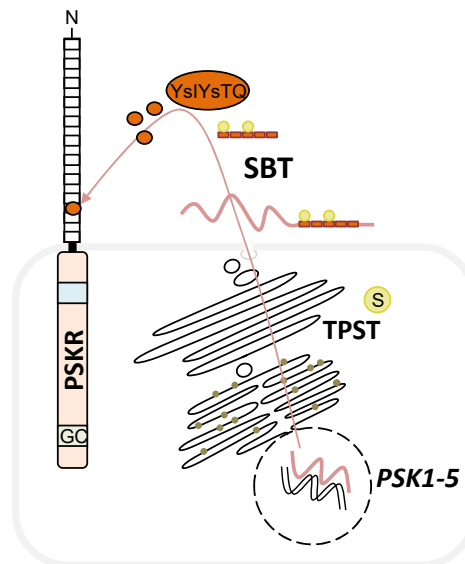


Abbildung 1: Die Phytosulfokinpeptidbildung in Arabidopsis.

Das PSK-Präpropeptid wird in Arabidopsis durch fünf Gene (*PSK1* - *PSK5*) kodiert. Nach der Transkription im Zellkern und der Translation sowie der co-translationalen Abspaltung der Signalsequenz im ER zu einem Propeptid, folgt ein Transport in den Golgi-Apparat. Dort wird das Propeptid im *cis*-Bereich des Apparats durch die Tyrosylproteinsulfotransferase (TPST) zweifach sulfatiert (S, gelbe Kreise). Nach der Sekretion in den Apoplast wird die PSK-Sequenz aus dem Propeptid freigesetzt. Für PSK4 ist SBT1.1 (SBT) am proteolytischen Prozess beteiligt. Das disulfatierte Pentapeptid (YsIYsTQ, dunkelorange Kreise) bindet an die Inseldomäne der PSK-Rezeptoren (PSKR) und wird dort erkannt. Innerhalb der intrazellulären Kinasedomäne der Rezeptoren (hellorange) befindet sich eine Calmodulinbindestelle (blau) und eine Domäne mit Guanylatzyklaseaktivität (GC, grün). In Anlehnung an Sauter (2015).

In Arabidopsis sind fünf exprimierte Gene bekannt, *PSK1* - *PSK5*, die nukleär für PSK-Präpropeptide kodieren (Lorbiecke & Sauter, 2002). Diese werden in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstufen der Pflanze unterschiedlich stark exprimiert (Matsubayashi *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2007; Kutschmar *et al.*, 2009). Nach dem Import in den Golgi-Apparat und einer Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz (Lorbiecke & Sauter, 2002) erfolgt eine posttranslationale Sulfatierung des Propeptids (Abbildung 1).

Diese geschieht durch die Aktivität der Tyrosylproteinsulfotransferase (TPST/ACTIVE QUIESCENT CENTER1, AQC1/HYPERSENSITIVE TO PI STARVATION 7, HPS7), die im *cis*-Golgi jeweils eine Sulfatgruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat auf die zwei Tyrosine des Propeptids überträgt (Moore, 2003; Komori *et al.*, 2009).

TPST ist in Arabidopsis das einzig bekannte Enzym mit einer Aktivität dieser Art und katalysiert somit auch die Sulfatierung anderer Peptidhormone wie PSY1 (PLANT PEPTIDE CONTAINING SULFATED TYROSINE 1), RGF1 (ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR 1) und CIFs (CASPARIAN STRIP INTEGRITY FACTORS) (Amano *et al.*, 2007; Komori *et al.*, 2009; Matsuzaki *et al.*, 2010; Nakayama *et al.*, 2017). Ein Verlust des *TPST*-Gens führt zu einem pleiotropen Phänotyp mit einem reduzierten Wachstum der gesamten Pflanze, hellgrünen Blättern und einer verfrühten Seneszenz, einer geringeren Anzahl zusätzlich veränderter Blüten und einer abnormalen Wurzelstammzellenanordnung sowie einer erhöhten Anzahl aneinanderhaftender Wurzelhaubenzellschichten (Komori *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Durch eine Behandlung mit exogenem disulfatierten PSK kann der Phänotyp von *tpst-1* teilweise revertiert (Matsuzaki *et al.*, 2010), in Kombination mit PSY1 und RGF1 das Wurzelwachstum der Mutante wieder auf Wildtypniveau komplementiert werden (Matsuzaki *et al.*, 2010).

Das sulfatierte PSK-Propeptid wird in den Apoplast sekretiert, wo eine proteolytische Spaltung stattfinden muss, um das disulfatierte Pentapeptid PSK freizusetzen (Abbildung 1, Seite 5). Veränderte PSK-Peptidsequenzen weisen eine tausendfach niedrigere Aktivität in Spargelzellkulturen auf (Matsubayashi *et al.*, 1996). In Arabidopsis ist bisher lediglich bekannt, dass das Propeptid von *PSK4* *in vitro* von einer subtilisinähnlichen Protease (SUBTILASE 1.1, SBT1.1) partiell prozessiert werden kann (Srivastava *et al.*, 2008). Das reife PSK-Peptid wird durch die LRR-RLKs PSKR1 und PSKR2 (PSK-RECEPTOR 1, -2) an der Plasmamembran perzipiert (Matsubayashi *et al.*, 2002; Shinohara *et al.*, 2007). Die Erkennung erfolgt an der extrazellulären, N-glucosylierten, leucinreichen Domäne der Rezeptoren mit einer Bindung von PSK an die Inseldomäne (Abbildung 1, Seite 5) (Matsubayashi *et al.*, 2002; Shinohara *et al.*, 2007). Dieser Bereich des Proteins ist über eine plasmamembrandurchspannende α -Helix mit der cytoplasmatischen Domäne verbunden (Matsubayashi *et al.*, 2006). Letztere beinhaltet eingebettet in der Kinasedomäne eine Calmodulinbindestelle und eine Domäne mit einer Guanylatzyklaseaktivität (Kwezi *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 2014).

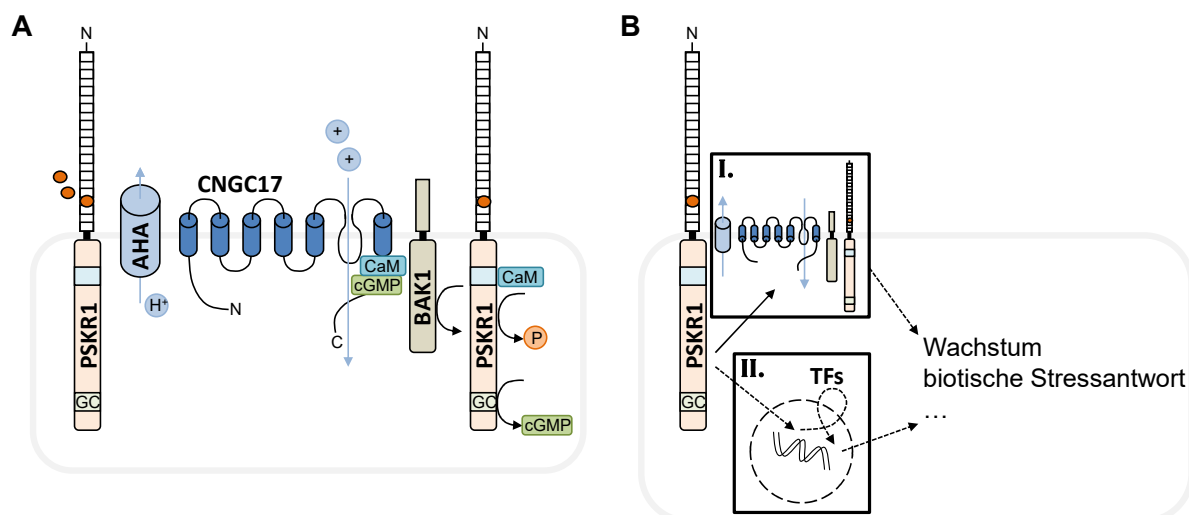


Abbildung 2: PSKR1-assoziiertes Proteinnanocluster an der Plasmamembran und Weiterleitung des PSK-Signals.

PSK wird an der Zelloberfläche durch PSKR1 perzipiert. Es bindet an die Inseldomäne der extrazellulären LRR-Domäne (weiße Vierecke). Verbunden über eine Transmembrandomäne befindet sich intrazellulär eine Ser/Thr-Kinasedomäne (hellorange), die zusätzlich über eine Bindungsregion für Calmodulin (CaM, blau) und eine Guanylatzyklasedomäne (grün) zur Produktion von cGMP verfügt. In Anlehnung an Ladwig *et al.* (2015) und Sauter (2015).

A PSKR1 interagiert mit dem Co-Rezeptor BAK1 und mit den H⁺-ATPasen AHA1 und AHA2. AHA1, AHA2 und BAK1 interagieren mit CNGC17, dessen Aktivität wiederum durch CaM und cGMP reguliert wird. Es wird angenommen, dass CNGC17 und BAK1 einen Proteinkomplex formen, der einen Kationenaustausch über die Plasmamembran reguliert.

B Die PSK-Signalweiterung findet über eine (I.) schnelle Antwort durch direkte Interaktionen in einem Nanocluster an der Plasmamembran statt (A) oder könnte durch (II.) Genregulationen unter Einbindung von Transkriptionsfaktoraktivierung/-aktivität (TFs) stattfinden.

Der PSK-Signalweg in Arabidopsis reguliert, nach bisherigen Erkenntnissen, vor allem die Wachstums- und Pathogenantwort der Pflanze (Matsubayashi *et al.*, 2006; Kutschmar *et al.*, 2009; Loivamäki *et al.*, 2010; Stührwohldt *et al.*, 2011; Igarashi *et al.*, 2012; Mosher *et al.*, 2013; Shen & Diener, 2013; Hartmann *et al.*, 2014; Stührwohldt *et al.*, 2014; Rodiuc *et al.*, 2016). Die pflanzliche Immunantwort scheint durch den PSK-Signalweg in Abhängigkeit von den Eigenschaften des jeweiligen Pathogens differentiell reguliert zu werden. Weniger die evolutionäre Verwandtschaft als mehr die Lebensform der beschriebenen Mikroorganismen scheint die PSK-abhängige Immunantwort der Pflanze zu beeinflussen (Rodiuc *et al.*, 2016). Gegen hemibiotrophe und biotrophe Organismen wird durch Ausschalten der PSK-Rezeptoren die Resistenz der Pflanze erhöht, für nekrotrophe Pathogene wird die Rezeptormutante anfälliger (Loivamäki *et al.*, 2010; Igarashi *et al.*, 2012; Mosher *et al.*, 2013; Shen & Diener, 2013; Rodiuc *et al.*, 2016). Eine Infektion mit nekrotrophen Pilzen reprimiert die Expression der PSK- und PSKR-Gene, ebenso Botenstoffe von Pilzen und Verwundung (Loivamäki *et al.*, 2010). Wohingegen der PSK-Signalweg wiederum die Expression von Genen für pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) reprimiert und dadurch die mustervermittelte Immunantwort (*pattern-triggered immunity*, PTI) inhibiert (Igarashi *et al.*, 2012). Zusätzlich zu einer Regulation der Pathogenantwort wird die Seneszenz durch den PSK-Signalweg verzögert (Mosher & Kemmerling, 2013).

Durch den PSK-Signalwegs wird das Wachstum der Primärwurzel, des Hypokotyls, der Rosettenblätter und des Pollenschlauchs gefördert (Matsubayashi *et al.*, 2006; Kutschmar *et al.*, 2009; Stührwohldt *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 2014; Stührwohldt *et al.*, 2014). Dieser Effekt wird vorwiegend durch Zellexpansion realisiert (Kutschmar *et al.*, 2009; Stührwohldt *et al.*, 2011), es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass der PSK-Signalweg das Wachstum auf Ebene der meristematischen Zellteilung reguliert (Matsubayashi *et al.*, 2006; Heyman *et al.*, 2013). Die pflanzliche Zellexpansion wird durch die Säure-Wachstums-Theorie beschrieben (Hager *et al.*, 1971; Rayle, 1973; Rayle & Cleland, 1992). Diese besagt, dass durch Auxin aktivierte H⁺-ATPasen Protonen in den Intermembranraum schleusen und dieser dadurch angesäuert wird. Dies wiederum bewirkt eine Auflockerung der Zellwand durch die Aktivität von zellwandmodulierenden Enzymen, was eine Ausdehnung der Zellen begünstigt (Braidwood *et al.*, 2014). Die Verminderung des zuvor durch die Zellwand aufrechterhaltenen Drucks auf die Zelle ruft eine Senkung des Wasserpotentials der Zellen hervor, was zu einem Wassereinstrom in die Zelle (Vakuole) führt. Dadurch wird wiederum der Druck, den die Zelle auf die Zellwand ausübt, erhöht und diese dehnt sich, was als Zellelongation sichtbar ist (Ray *et al.*, 1972; Braidwood *et al.*, 2014).

PSKR1 interagiert an der Plasmamembran mit Proteinen, die in das Zellwachstum involviert sind oder sein könnten (Abbildung 2 A, Seite 7) (Ladwig *et al.*, 2015). Eine Interaktion mit den H⁺-ATPasen AHA1 und AHA2, welche zur Ansäuerung der Zellwand beitragen, wurde bereits nachgewiesen (Ladwig *et al.*, 2015). Diese wiederum interagieren mit dem Kanalprotein CNGC17 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 17), das ein Einschleusen positiv geladener Ionen unbekannter Art begünstigt, was wiederum einen Wassereinstrom mit sich bringen könnte. CNGC17 interagiert mit dem Co-Rezeptor BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1), der wiederum mit PSKR1 interagiert (Ladwig *et al.*, 2015). Zusätzlich zu einer direkten Interaktion von PSKR1 an der Plasmamembran und einer dadurch hervorgerufenen Reaktion ist die Weiterleitung des Signals in den Zellkern und eine dadurch verursachte mögliche Regulation der Aktivität anderer Gene bisher noch nicht beschrieben (Abbildung 2 B, Seite 7).

Die bisher bekannten durch den PSK-Signalweg regulierten Reaktionen von Arabidopsis werden zum größten Teil durch die Wirkung von PSKR1 vermittelt. PSKR2 stand bisher kaum im Fokus der Forschung und seine Funktion ist nur zu einem geringen Teil aufgeklärt. Bei der Weiterleitung des PSK-Signals scheint er im Vergleich zu PSKR1 eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies ist sowohl für die Wurzelelongation (Kutschmar *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2013) als auch das Hypokotylwachstum (Stührwohldt *et al.*, 2011) und die pflanzliche Immunantwort beschrieben (Igarashi *et al.*, 2012). Es wird angenommen, dass PSKR1 und PSKR2 die einzigen Rezeptoren für PSK sind, da die Pflanze bei einem Ausschalten der zugehörigen Gene insensitiv gegenüber dem exogenen Peptidhormon ist (Amano *et al.*, 2007; Stührwohldt *et al.*, 2014).

1.4 Austrocknung und osmotischer Stress

Eine Regulation der biotischen Stressantwort durch PSK wurde bereits gezeigt (Loivamäki *et al.*, 2010; Igarashi *et al.*, 2012; Mosher *et al.*, 2013; Shen & Diener, 2013; Rodiuc *et al.*, 2016), in Bezug auf abiotischen Stress sind bisher jedoch keine Daten verfügbar. Eine effiziente Anpassung an eine sich wandelnde Umwelt und den durch diese erzeugten Stress ist die Grundlage für das Überleben von Pflanzen. Zu den abiotischen Stressfaktoren gehören ein Überschuss oder Mangel an Wasser, (Nähr-)Stoffen, Strahlung und Temperaturextreme. PSK reguliert das Wachstum von *Arabidopsis* primär über Zellexpansion (Kutschmar *et al.*, 2009; Stührwohldt *et al.*, 2011), die durch Wasserinflux hervorgerufen wird, welcher wiederum von der Verfügbarkeit von Wasser abhängig ist. Genexpressionsdaten deuten darauf hin, dass der PSK-Signalweg durch Trocken-, Salz- und osmotischen Stress induziert wird. Sowohl *PSK2* als auch *PSK3* und *PSKR1* werden durch Salz induziert, *PSK2* zusätzlich durch Trocken- und *PSK3* durch osmotischen Stress (Kilian *et al.*, 2007).

Hohe Salzkonzentrationen und Trockenheit, aber auch Kälte haben in der Pflanze sich überschneidende Effekte auf physiologischer, biochemischer und molekularer Ebene (Xiong *et al.*, 2002; Sairam & Tyagi, 2004; Krasensky & Jonak, 2012). Jeder dieser Stressoren kann eine Austrocknung der Pflanze verursachen. Es wird unterschieden in Boden- und atmosphärische Austrocknung, in der jeweils das umgebende Milieu betrachtet wird. Die Bodenaustrocknung kann wiederum physikalischen oder physiologischen Ursprungs sein. Die physikalische Austrocknung beruht auf einer tatsächlichen Wasserknappheit bei einer Wasserlimitierung oder -abwesenheit im Erdreich. Die physiologische Austrocknung tritt auf, wenn Wasser im Wurzelraum vorhanden ist, dieses aber aufgrund eines geringen Wasserpotentials, zum Beispiel verursacht durch eine hohe Salzkonzentration, nicht für die Pflanze verfügbar ist. Sowohl Trockenstress (physikalische Austrocknung) als auch Salzstress (physiologische Austrocknung) induzieren Reaktionen in der Pflanze, welche vielfach auf (hyper-)osmotischen Stress zurückzuführen sind (Munns, 2002; de Oliveira *et al.*, 2013). Dies bedeutet, dass der Pflanze, aufgrund des geringeren Wasserpotentials der Umgebung und somit auch des osmotischen Potentials bei einer höheren Salzkonzentration, Wasser nicht zugänglich ist, das die Pflanze für den Erhalt ihres Wachstums und Metabolismus benötigt (Chaitanya *et al.*, 2003). Salzstress ruft, zusätzlich zum osmotischen, ionischen Stress hervor, der durch die Aufnahme von Salzen entsteht (Shabala, 2000; Munns & Tester, 2008). Daher haben Trockenstress und Salzstress einzigartige aber auch überlappende Signale. (Zhu, 2002, 2016).

Tritt in der Pflanze osmotischer Stress auf, ruft dies Antworten auf molekularer, zellulärer und auf Ebene der gesamten Pflanze hervor (Munns, 2002; Xiong & Zhu, 2002; de Oliveira *et al.*, 2013). Einige der Antworten werden durch primäre Signale hervorgerufen, andere durch sekundäre Stresse/Signale, die durch die primären bedingt werden. Primäre Effekte, die mit dem osmotischen Stress einhergehen und diesen bedingen, sind eine Reduktion des Wasserpotentials, eine Dehydrierung der Zelle und eine hydraulische Resistenz, also eine Reduktion der Durchflussrate in der Pflanze (de Oliveira *et al.*, 2013).

Die sekundären Effekte sind vielfältig und komplex. Je nach Stärke und Dauer des Stresses treten alle oder nur einige davon auf. Sekundäre Signale, die diese Prozesse regulieren, können unter anderem Phytohormone oder sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) sein (de Oliveira *et al.*, 2013). Der früheste Effekt, der induziert wird, ist eine Wachstumsreduktion des Sprosses, verursacht durch eine verringerte Zellexpansion (Boyer, 1970; Meyer & Boyer, 1972; Hsiao, 1973; Munns & Termaat, 1986; Parent *et al.*, 2009; Tisné *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2011). Es folgen weitere Prozesse wie die Regulation der Öffnungsweite der Stomata, durch die der Wasserverlust limitiert werden kann (Tanaka *et al.*, 2005; Bogaert-Triboulot *et al.*, 2007). Diese frühe Reaktion kann, aufgrund der verminderten Gasdiffusion und metabolischer Veränderungen, zu einer Reduktion der Photosyntheseaktivität führen (Pinheiro & Chaves, 2010; Wang *et al.*, 2018). Eine weitere Einschränkung der Austauschfläche wird durch die Reduktion der Form und Anzahl der Blätter erreicht (Reymond *et al.*, 2003). Zudem kann die Wasseraufnahme durch die Bildung eines komplexeren oder weitreichenderen Wurzelsystems optimiert werden (Costa França *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2001; Chaves *et al.*, 2003). Das Wurzel-Spross-Verhältnis wird tendenziell vergrößert, was sowohl durch ein verstärktes Wurzelwachstum als auch eine starke Reduktion des Sprosswachstums bedingt sein kann (Chartzoulakis *et al.*, 1993; Hsiao & Xu, 2000; Bogaert-Triboulot *et al.*, 2007; Erice *et al.*, 2010). Meist ist das Wurzelwachstum jedoch weniger stark beeinflusst als das Sprosswachstum (French & Turner, 1991; Spollen *et al.*, 1993; Shao *et al.*, 2008). Durch eine osmotische Anpassung (*osmotic adjustment*) kann die Gewebedehydratation eingeschränkt und der Turgor erhalten werden. Diese wird durch Einlagerung osmotisch aktiver Substanzen erreicht, zu welchen anorganische Ionen, organische Säuren, Kohlenhydrate und Aminosäuren zählen (Hsiao *et al.*, 1976; Munns *et al.*, 1988; Nguyen *et al.*, 1997; Hummel *et al.*, 2010; Sanders & Arndt, 2012). Diese Substanzen helfen zusätzlich bei der Proteinfaltung und dem Erhalt der Membranintegrität, bei dem Erhalt des Redoxpotentials und dienen als metabolische Signale (Smirnoff & Cumber, 1989; Nuccio *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2000; Szabados *et al.*, 2011). Ist die Pflanze nicht in der Lage adäquat auf den Stress zu reagieren, kommt es zur Beschädigung zellulärer Bestandteile wie Membranlipiden, Proteinen und Nukleinsäuren, einem Arrest der Photosynthese, metabolischer Dysfunktion und letztendlich zum Absterben (Zhu, 2002; Shao *et al.*, 2008; Zhu, 2016).

Die Antworten der Pflanze auf osmotischen Stress werden durch ein komplexes Regulationsnetzwerk unterschiedlicher Signalwege induziert. Dieses nutzt sowohl Lang- als auch Kurzstreckentransportwege und umfasst unterschiedliche Komponenten wie Phytohormone, *second messenger* und TFs, die veränderte Genexpressionen hervorrufen können (Xiong & Zhu, 2002; Sanders & Arndt, 2012; Yoshida *et al.*, 2014; Fernando & Schroeder, 2016).

1.5 Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA)

Viele der Prozesse, die durch osmotischen Stress in der Pflanze hervorgerufen werden, werden durch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) vermittelt (Kim *et al.*, 2010). Bei ABA handelt es sich um ein Sesquiterpen mit der Summenformel $C_{15}H_{20}O_4$, das sowohl ein Signalvermittler in vielen Stressreaktionen ist als auch Entwicklungsprozesse von Pflanzen und Tieren reguliert (Leung & Giraudat, 1998; De Smet *et al.*, 2003; Tuteja, 2007; Li *et al.*, 2011; Planes *et al.*, 2014). Das Phytohormon wurde zuerst aus Früchten von *Gossypium* L. (Baumwolle) isoliert (Ohkuma *et al.*, 1963). Da eine Behandlung der Abszissionszone mit dem Hormon eine Abszission der Früchte hervorrief, wurde es zunächst als Abscisin II betitelt. Im selben Jahr wurde ein Hemmstoff aus Blättern von *Betula pubescens* (Moorbirke) isoliert (Ohkuma *et al.*, 1963). Bei einer Behandlung von Knospen wachsender Keimlinge mit diesem Hormon, gingen diese in einen dormanten Zustand über, weshalb der Inhibitor als Dormin bezeichnet wurde. Kurz darauf wurde Dormin aus Blättern von *Acer pseudoplatanus* L. (Bergahorn) isoliert (Cornforth *et al.*, 1965, 1966) und festgestellt, dass es sich hierbei um denselben Stoff wie Abscisin II handelt. Im Jahr 1967 wurde der gemeinsame Name Abscisinsäure (*abscisic acid*) eingeführt. Nach bisherigen Erkenntnissen sind Ethylen und Auxin Gegenspieler und zentrale, hormonelle Regulatoren der Abszission (Taylor & Whitelaw, 2001; Nakano & Ito, 2013). Die Rolle von ABA in diesem Prozess ist kontrovers diskutiert (Taylor & Whitelaw, 2001). Eine neuere Studie gab jedoch Hinweise darauf, dass ABA die Blütenorganabszission reguliert (Ogawa *et al.*, 2009). Daher ist der Name Abscisinsäure teilweise irreführend.

Durch die Abstimmung von *de novo* Synthese, Aktivierung und Abbau des Hormons wird die Konzentration von ABA und somit seine Signalwirkung in der Pflanze metabolisch reguliert. Die Synthese von ABA in Pflanzen beginnt in den Plastiden, vorwiegend in Chloroplasten, und wird im Folgenden vereinfacht beschrieben (Abbildung 3, Seite 12) (Milborrow & Lee, 1998). Der erste Ausgangsstoff ist Isopentenylpyrophosphat, dessen Ursprung überwiegend von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat herrührt (Milborrow & Lee, 1998; Hirai *et al.*, 2000; Kasahara *et al.*, 2004). Dieser wird über weitere Zwischenprodukte zu Zeaxanthin als erstem oxygenierten Carotinoid umgewandelt (Sun *et al.*, 1996; Tian & DellaPenna, 2001; Tian *et al.*, 2003). Aus diesem entsteht zunächst Violaxanthin, das weiter umgewandelt werden kann zu 9'-*cis*-Violaxanthin oder 9'-*cis*-Neoxanthin (Li & Walton, 1990; Parry *et al.*, 1990; Rock & Zeevaart, 1991; North *et al.*, 2007). Diese beiden Produkte werden durch 9'-*cis*-Epoxy-carotinoiddioxygenasen (NCEDs) zu Xanthoxin umgewandelt (Tan *et al.*, 2003; Nambara & Marion-Poll, 2005). In Arabidopsis wird NCED3 (NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3) als zentrales Enzym für diesen Schritt angesehen (Iuchi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003), unterstützt durch NCED5 (NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 5) (Frey *et al.*, 2012). Durch die Aktivität einer Alkoholdehydrogenase/Reduktase, in Arabidopsis kodiert durch *ABA2* (*ABA DEFICIENT 2*), kommt es im Cytoplasma zur Umwandlung von Xanthoxin zu Abscisinsäurealdehyd (Rook *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; González-Guzmán *et al.*, 2002). Dieses wird in einem finalen

Schritt zu biologisch aktiver (+)-S-Abscisinsäure umgewandelt (Bittner *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2001).

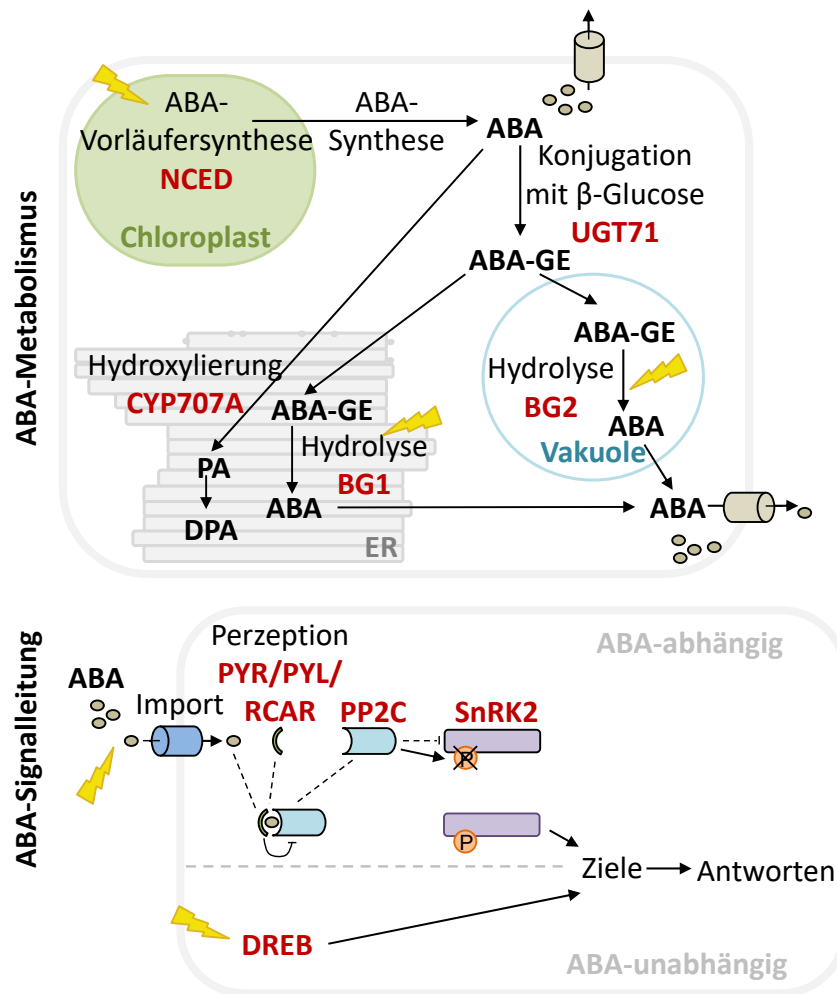


Abbildung 3: ABA-Metabolismus und Signalleitung bei osmotischem Stress.

Bei osmotischem Stress (gelbe Blitze) werden ABA-Vorläufer im Chloroplasten aus β -Carotin gebildet und durch 9-*cis*-Epoxy-carotino-dioxygenasen (NCED) in Xanthoxin umgewandelt, aus dem im Cytosol ABA gebildet wird. Dieses kann nun als Signalmolekül wirken oder durch Konjugation mit β -Glucose, durch Uridindiphosphatglucosyltransferasen (UGT71) zu einem ABA-Glucosylester (ABA-GE), inaktiviert werden. Bei osmotischem Stress kann ABA-GE in der Vakuole oder im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch β -Glucosidasen (BG) hydrolysiert und ABA wieder freigesetzt werden. Durch Hydroxylierung mittels ABA 8'-Hydroxylasen (CYP707A) wird eine irreversible Inaktivierung durch Umwandlung in Phaseinsäure (PA) und Dihydrophaseinsäure (DPA) ausgelöst.

Im Cytosol bildet ABA mit rezeptorähnlichen Proteinen (PYR/PYL/RCAR-Rezeptorfamilie) und Co-Rezeptoren der Proteinphosphatase 2C-Familie (PP2C) einen Komplex. Dadurch wird die Phosphataseaktivität der PP2Cs inhibiert. Ist ABA nicht gebunden, unterdrücken die PP2Cs die Phosphorylierung und somit Aktivierung von Proteinen der SNF1-RELATED KINASE 2-Familie (SnRK2), die wiederum ABA-Antworten induzieren. Osmotische Stressantworten unabhängig vom ABA-Signalweg können durch den DREB2A (DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING 2A) TF aktiviert werden.

Pfeile zeigen Induktionen, Transportwege und Ablaufrichtungen an. Linien mit Querstrich zeigen Repressionen an, gestrichelte Linien zeigen indirekte Wege und Abgrenzungen an. Schwarz und dick geschrieben sind ABA-Synthese(-zwischen-)produkte, rot und dick geschrieben sind an Kernprozessen des ABA-Metabolismus und -Signalleitung sowie der osmotischen Stressantwort beteiligte Proteine/-familien.

Durch die Aktivität von Uridindiphosphatglucosyltransferasen (UGTs) kann ABA mit Glucose zu einem ABA-Glucoseester (ABA-GE) konjugiert und dadurch inaktiviert werden (Lim *et al.*, 2005). In Arabidopsis umfasst die Familie der UGTs Schätzungen zu Folge etwa 120

Mitglieder (Li *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2014). Bisher sind vier Mitglieder dieser Gruppe als ABA-GE-bildend identifiziert worden, UGT71B6, -B7, -B8 und -C5 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 71B6, -B7, -B8, -C5) (Dong *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015c). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass weitere an der Glykosylierung von ABA beteiligt sind. ABA-GE wird in der Vakuole gespeichert und kann interzellulär transportiert werden (Koshimizu *et al.*, 1966; Dietz *et al.*, 2000; Hartung *et al.*, 2002; Sauter *et al.*, 2002; Jiang & Hartung, 2008). Durch Hydrolyse des Glucoseesters, entweder in der Vakuole durch BG2 (*Arabidopsis thaliana* BETA-GLUCOSIDASE 2/BETA GLUCOSIDASE 33, BGLU33) (Xu *et al.*, 2012) oder in ER-Körperchen durch BG1 (*Arabidopsis thaliana* BETA-GLUCOSIDASE 1/BETA GLUCOSIDASE 18, BGLU18/BETA-GLUCOSIDASE HOMOLOG 1, BGL1) (Lee *et al.*, 2006a), wird ABA reaktiviert. Zusätzlich zu einer temporären Inaktivierung kann ABA irreversibel abgebaut werden. Dies wird überwiegend durch ABA 8'-Hydroxylasen des Cytochrom P450-Typs katalysiert. In *Arabidopsis* kodieren vier Gene für diese Hydroxylasen, CYP707A1, -A2, -A3 und -A4 (CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1, -2, -3, -4), deren Aktivität eine Umwandlung zu Phaseinsäure (PA) und seinem Derivat Dihydrophaseinsäure (DPA) katalysiert (Kushiro *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004).

ABA kann sowohl in der Wurzel als auch im Spross produziert werden. Entgegen früherer Annahmen scheint jedoch der Spross der Hauptsyntheseort zu sein (McAdam *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018a). Ein Transport von sowohl ABA als auch ABA-GE zwischen Spross und Wurzel hat zusätzlich zu seiner Synthese einen hohen Einfluss auf die Akkumulation des Hormons in bestimmten Geweben. Dieser Transport kann sowohl basipetal, vom Spross in die Wurzel, als auch akropetal erfolgen. Auf langer Strecke erfolgt dieser über das Vaskularsystem, auf kurzer Strecke über Diffusion oder unterstützt durch Transporter (Jeschke *et al.*, 1997; Hartung *et al.*, 2002). Der aktive Transport, sowohl Import als auch Export, geschieht vor allem über ABC-Transporter (ATP-binding cassette), speziell Mitglieder der ABCG-Unterfamilie, jedoch auch über einige andere (Boursiac *et al.*, 2013).

Eine Perzeption von ABA wurde bereits in den 1990er Jahren sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle nachgewiesen (MacRobbie, 1995; Leung & Giraudat, 1998). Bisher wurden Rezeptoren in den Chloroplasten, an der Plasmamembran und im Cytosol beschrieben (Shen *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2009; Kline *et al.*, 2010). Die Perzeption und Signalweiterleitung im Cytosol ist hiervon am besten untersucht. Rezeptorähnliche Proteine der PYR/PYL/RCAR-Familie (PYRABACTIN RESISTANCE 1/PYR-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR) binden zusammen mit einem Co-Rezeptor ABA. Als Co-Rezeptoren dienen Mitglieder der A-Gruppe der PP2C-Proteine (PROTEIN PHOSPHATASE 2C) (Nishimura *et al.*, 2010), die bei Abwesenheit von ABA verhindern, dass SnRK2-Proteine (SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASES 2) phosphoryliert werden und das Signal weitergeleitet werden kann (Park *et al.*, 2010). Zum Beispiel verhindert das PP2C-Protein ABI1 (ABA INSENSITIVE 1) die Phosphorylierung der calciumunabhängigen SnRK2 OST1 (OPEN STOMATA 1/SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE 2.6, SnRK2.6) und anderer calciumabhängiger Kinasen (Geiger *et al.*, 2010). Steigt die ABA-Konzentration werden dadurch sowohl die PYR/PYL/RCAR- als auch die PP2C-Proteine gebunden und die SnRK2-Proteine können phosphoryliert und nachfolgende Signalwege

reguliert werden (Kobayashi *et al.*, 2005). Dadurch kann letztendlich die Aktivität von TFs und plasmamembranlokalisierte Proteine wie Ionenkanäle reguliert werden (Kulik *et al.*, 2011). Durch die Bindung von ABI1 bei erhöhter ABA-Konzentration wird das Öffnen des Anionenkanals SLAC1 (SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1) im Chloroplasten durch OST1 reguliert, was zum Stomaschluss führt (Geiger *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009b). Der durch den ABA-Signalweg induzierte TF ABI3 (ABA INSENSITIVE 3) unterstützt die Trockenstressantwort und reguliert das Ausbleichen von Embryonen und Blättern (Alonso *et al.*, 2009; Delmas *et al.*, 2013; Bedi *et al.*, 2016).

Auch unabhängig von ABA kann die Pflanze auf Trockenstress reagieren (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006; Cutler *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012). Dies geschieht über TFs der DREB-Subfamilie (*dehydration-responsive element-binding proteins*) der AP2/EREBP-TFs (APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN). Viele dieser TFs aktivieren Gene, die ebenso über den ABA-Signalweg aktiviert werden können, was ein komplexes Interaktionsnetzwerk zwischen ABA-abhängiger und -unabhängiger Antwort ermöglicht (Lee *et al.*, 2010; Roychoudhury *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2014). Einer der ABA-unabhängig stressinduzierten TFs ist DREB2A (DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2A), der spezifisch an das DRE-Element (*dehydration-responsive element*) bindet, das in vielen stressinduzierten Genen vorhanden ist (Nakashima *et al.*, 2000; Sakuma *et al.*, 2002). Seine Expression wiederum wird durch Salz-, Trocken- und osmotischen Stress induziert (Sakuma *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2011).

Grundsätzlich wird ABA als zentrales Stresshormon angesehen, dessen Signalwirkung meist inhibierende Effekte erzielt. Die Wirkung von ABA begleitet die gesamte Entwicklung der Pflanze, nicht nur in genetisch determinierten Prozessen, sondern speziell in Antwort auf Umweltfaktoren. ABA wirkt, unter anderem im Zusammenspiel mit anderen Phytohormonen, an der Regulation der Keimung, des Wachstums und der Differenzierung, sowie der Seneszenz (Karssen *et al.*, 1983; Hussain *et al.*, 2000; De Smet *et al.*, 2003; LeNoble *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007; Nibau *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009; Planes *et al.*, 2014; Harris, 2015; Skubacz & Daszkowska-Golec, 2017). Während des vegetativen Wachstums spielt ABA in der Vermittlung der Antwort auf abiotischen Stress wie Trockenheit, Salz und Kälte eine entscheidende Rolle (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006; Qin *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012) und reguliert die Resistenz gegen biotische Stressfaktoren (Ton *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2011; Finkelstein, 2013).

1.6 Transkriptionsfaktoren in Arabidopsis

Stromabwärts der PSK-Rezeptoren sind, zusätzlich zu der direkten Protein-Protein-Interaktion von PSKR1 an der Plasmamembran (Abbildung 2 A, Seite 7), keine Signalwege identifiziert. Zusätzlich könnte das PSK-Signal in den Kern geleitet werden und dort eine Veränderung der Genaktivität bewirken (Abbildung 2 B, Seite 7). Veränderungen dieser Art werden durch TFs reguliert.

TFs regulieren die Transkription durch Bindung an *cis*-regulatorische Elemente oder TF-Bindestellen von Zielgenen (Latchmann, 1997; Shlyueva *et al.*, 2014). Sie Bindestellen befinden sich überwiegend im 5'-Bereich vor dem jeweiligen Zielgen, an welche die Faktoren allein oder in Interaktion mit anderen Proteinen binden. Dies kann zu einer verstärkten oder reprimierten Transkriptionsrate, Proteinbiosynthese und daraus resultierend einer Veränderung der Zellfunktion führen (Adcock & Caramori, 2009). Je nach Ansicht unterschiedlicher Autoren werden auch nicht-DNA-bindende Proteine als TFs bezeichnet, die die Transkription durch Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen beeinflussen, sowie chromatinremodellierende Proteine, die die Bindung anderer Faktoren an Promotoren erleichtern (Singh, 1998; Riechmann, 2002). Gegenstand dieser Arbeit sind die DNA-bindenden TFs.

DNA-bindende TFs werden in basale/unbestimmte und sequenzspezifische Proteine unterschieden. Letztere gehören zu den ausschlaggebenden Schlüsselementen der Regulation einer differentiellen Genexpression (Riechmann *et al.*, 2000). Sie binden selektiv an bestimmte Erkennungssequenzen der DNA und werden meist gewebs-, entwicklungs- und zelltypspezifisch sowie stimulusabhängig exprimiert (Riechmann, 2006). Die Expression der pflanzlichen TF-Gene wird auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene reguliert, während die Aktivität der TFs selbst posttranslational abgestimmt wird (Liu *et al.*, 1999). TFs sind vor allem für die intrazelluläre Kommunikation zuständig. Es gibt jedoch einige Ausnahmen, in denen eine interzelluläre Signalleitung stattfindet (Helariutta *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2007; Schlereth *et al.*, 2010).

Das pflanzliche Genom scheint im Durchschnitt für mehr TFs zu kodieren als das tierische (Riechmann *et al.*, 2000). Das Genom von *Arabidopsis* umfasst beispielsweise etwa 135 Mbp (Swarbreck *et al.*, 2008), mit etwa 2000 Genen, die als TF-kodierend klassifiziert sind, wohingegen in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, die über Genome vergleichbarer Größe verfügen, zwischen 700 und 1000 Gene dieser Art existieren (Hammonds *et al.*, 2013; Rhee *et al.*, 2014; Gonzalez, 2015; Narasimhan *et al.*, 2015). Dies und die große Diversität von TF-Familien wird dadurch erklärt, dass Pflanzen aufgrund ihrer immobilen Lebensform besonders effektiv und differentiell auf äußere Reize reagieren können müssen (Shiu *et al.*, 2005).

Die fünf größten der über 51 Familien sequenzspezifischer TFs in *Arabidopsis* sind die AP2/EREBP- und NAC-TFs (NO APICAL MERISTEM, ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR 1/2, and CUP-SHAPED COTYLEDON 2), die bHLH- (*basic helix-loop-helix*) und MYB-Domänenproteine sowie C2H2-Zinkfingerproteine, die jeweils jedoch nur etwa 9% der Gesamtanzahl an TFs ausmachen (Riechmann *et al.*, 2000; Gonzalez, 2015). Etwa 20% der TFs in *Arabidopsis* enthalten Zinkfinger motive. Es wird angenommen, dass sich die einzelnen Familien unabhängig voneinander entwickelt haben. Deshalb werden sie nicht als eine zusammengehörige Familie angesehen (Riechmann *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* ist etwa die Hälfte der sequenzspezifischen TF pflanzenspezifisch (Riechmann *et al.*, 2000). TF-Familien dieser Art schließen unter anderem die AP2/EREBP- und die NAC-TFs, WRKY- und DOF-Zinkfingerproteine (DNA BINDING WITH ONE FINGER), Trihelix DNA-Bindeproteine, ARFs (AUXIN RESPONSE FACTORS) und andere kleinere Gruppen ein

(Riechmann *et al.*, 2000; Gonzalez, 2015). Ebenfalls viele Mitglieder enthalten die bZIP- (*basic leucine zipper*), die MADS-Box- (MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1, AGAMOUS, DEFICIENS, and SERUM RESPONSE FACTOR) und die HB-TF-Familien (Homöobox), die jedoch nicht pflanzenspezifisch sind (Gonzalez, 2015). Die differentielle Genexpression, die durch diese Familien vermittelt wird, ist der Schlüssel für die Kontrolle des pflanzlichen Wachstums und der Entwicklung unter sich verändernden Umweltbedingungen und Anforderungen (Gonzalez, 2015).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das PSK-vermittelte Wachstum geschieht vorwiegend über Zellexpansion durch Wasserinflux. Bei osmotischem Stress ist die Wasseraufnahme der Pflanze durch äußere Faktoren limitiert und das Wachstum dadurch meist reduziert. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und inwiefern der PSK-Signalweg die osmotische Stressantwort in *Arabidopsis* reguliert.

- Verändert das Vorhandensein oder die Abwesenheit der PSK-Rezeptoren die Antwort der Pflanze auf osmotischen Stress?
- Wird die Aktivität der PSK- und PSK-Rezeptorgene durch osmotischen Stress reguliert?
- Steht die osmotische Stressantwort, vermittelt durch ABA, im Zusammenhang mit dem PSK-Signalweg?

Durch welchen molekularen Mechanismus PSK das Wachstum der Pflanze verstärkt ist bisher nicht aufgeklärt. Eine Option ist die direkte Protein-Protein-Interaktion von PSKR1 im Nanocluster an der Plasmamembran. Eine weitere Möglichkeit wäre die Regulation der Genexpression stromabwärts der PSK-Rezeptoren durch TFs. Daher sollte untersucht werden, ob der PSK-Signalweg die Expression von TFs reguliert und ob diese das Wachstum der Pflanze beeinflussen.

- Welche TFs werden durch den PSK-Signalweg reguliert?
- Regulieren diese TFs die PSK-abhängige Wachstumsantwort?
- Beeinflussen PSK-regulierte TFs die osmotische Stressantwort?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien verfügten über einen Reinheitsgrad zur Analyse und wurden von der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Alle genutzten Enzyme und die dazugehörigen Puffersysteme wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) geliefert. Eventuelle Abweichungen sind im Textverlauf angegeben.

2.1.2 Medien und Reagenzien

Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Medien und Reagenzien wurde Wasser der Qualität *aqua bidest* aus einer SG-Reinstwasser System Anlage (SG-Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH, Hamburg, Deutschland) genutzt. Für sterile Arbeiten wurden die Lösungen und Medien für 20 min auf 125°C und $2 \cdot 10^5$ Pa erhitzt oder durch Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm oder 0,45 µm) gereinigt. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind dem jeweils zugehörigen Methodenkapitel zu entnehmen.

2.1.3 Größenstandards

Als Größenstandards dienten der SmartLadder (Kaneka Eurogentec S.A., Seraing, Belgien) für gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente mit Größen zwischen 200 bp und 10 kb, sowie der O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) für Fragmentgrößen zwischen 10 bp und 300 bp.

2.1.4 Primer

Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten über Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden von der Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Diese wurden entweder im HPSF-Verfahren (High Purity Salt Free) aufgereinigt für Klonierungen und quantitative Realtime-PCR oder entsalzt für RT-PCR-Analysen zur Expressionsuntersuchung eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden durch Zugabe einer durch den Hersteller angegebenen Menge Wasser (*aqua bidest*, autoklaviert) als 100 µM Stammlösung angesetzt und als 10 µM Arbeitslösung verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C oder -80°C für Primer, die als 100 mM Lösung in quantitativen Realtime-PCRs eingesetzt wurden. Eine Liste der verwendeten Primer ist dem Anhang (Tabelle 11) zu entnehmen.

2.1.5 Vektoren

Zur Klonierung von Vektorkonstrukten wurde in dieser Arbeit der Gateway™ pENTR™1A Dual Selection Vector (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) als Klonierungsvektor zusammen mit dem binären Überexpressionsvektor pB7WG2.0 (Karimi *et al.*, 2002) im Invitrogen™ Gateway™ Rekombinationsklonierungssystem eingesetzt (Tabelle 1). Übersichtsabbildungen für diese Vektoren sowie eine ausführliche Liste der in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Konstrukte sind dem Anhang (Abbildung 59, Abbildung 60, Tabelle 12) zu entnehmen.

Tabelle 1: In dieser Arbeit für Klonierungen verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Resistenzen	Art des Vektors	Ursprung
Gateway™ pENTR™1A Dual Selection Vector	Kanamycin	Klonierungsvektor	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
pB7WG2.0	Spectinomycin, BASTA®	Überexpressionsvektor	Karimi <i>et al.</i> (2002)

2.1.6 Mikroorganismen

Zur Vermehrung der DNA bei Klonierungen von Plasmiden wurden *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*) des Stamms DH5α verwendet. Zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.)-Pflanzen (*Arabidopsis*) kam der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm (*A. tumefaciens*) GV3101 (van Larebeke *et al.*, 1974; Koncz & Schell, 1986) zum Einsatz.

2.1.7 Pflanzenmaterial

Alle beschriebenen Untersuchungen wurden an dem Ökotyp Columbia-0 (Col-0) von *Arabidopsis* und Pflanzen mit Mutationen in diesem genetischen Hintergrund durchgeführt. T-DNA-Insertionslinien wurden vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (Loughborough, England (Scholl *et al.*, 2010)) bezogen und sowohl auf genomischer Ebene auf die jeweilige Integration als auch auf cDNA-Ebene auf eine Expressionsreduktion des jeweiligen Gens untersucht. Die T-DNA-Insertionslinien *tpst-1*, *pskr1-3*, *pskr1-3 pskr2-1* und *pskr2-1* wurden von M. Sauter (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland (Amano *et al.*, 2007; Komori *et al.*, 2009; Kutschmar *et al.*, 2009; Stührwohldt *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 2013)) zur Verfügung gestellt. Die Überexpressionslinien *GAZox #4*, *#5*, *#10* und *GAZ SRDX* stammen von J. Lim (Konkuk University, Seoul, Korea (Lee *et al.*, 2016)). Ausführliche Listen der in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Linien sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 13, Tabelle 14, Tabelle 15).

2.1.8 Mikroskope und bildgebende Geräte

Für mikroskopische Untersuchungen und zur bildgebenden Dokumentation wurden folgende Geräte verwendet:

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete bildgebende Medien.

Gerät	Modell	Software
Digitalkamera	Canon PowerShot SX220HS (Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland)	-
Mikroskop	BX41 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)	-
Kamera 1 (Mikroskop)	U-CMAD3 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)	Software Cella Version 2.6 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland)
Kamera 2 (Mikroskop)	Infinity 3S (Lumenera Corporation, Ottawa, ON Kanada)	INFINITY ANALYZE Version 6.5.4 (Lumenera Corporation, Ottawa, ON Kanada)
Binokular	Nikon SMZ18 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland)	-
Kamera (Binokular)	DIGITAL SIGHT-Ri1 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland)	NIS-Elements Imaging Software Version 4.40 (Laboratory Imaging s.r.o., Prag, Tschechische Republik)

2.1.9 Programme zur computergestützten Sequenzanalyse und statistischen Auswertung

Die folgend aufgeführten Programme und Internetseiten wurden zur Auswertung, zum Vergleich und zur Vorhersage von Sequenzen und Expressionsdaten sowie zur statistischen Analyse verwendet.

Tabelle 3: In dieser Arbeit genutzte Programme und Internetressourcen.

Programm	Herkunft	Verwendung
ClustalX2	Larkin <i>et al.</i> (2007)	Alignment-Darstellung
eFP-Browser „Arabidopsis electronic Fluorescent Protein Browser“	Winter <i>et al.</i> (2007)	Arabidopsis-Datenbank für Expressionsmuster
ExpASy Proteomics Server	Gasteiger <i>et al.</i> (2003)	Portal für bioinformatische Ressourcen
Genevestigator	Hruz <i>et al.</i> (2008)	Datenbank für Arabidopsis-Expressionsanalysen
ImageJ 1.46r Software	Schindelin <i>et al.</i> (2012)	Quantifizierung von Wurzellängen
NCBI BLAST®	Boratyn <i>et al.</i> (2013)	Datenbank, Sequenzvergleich
NCBI Primer-BLAST	Ye <i>et al.</i> (2012)	Vorhersage und Überprüfung von Primern
NEBcutter V2.0	Vincze <i>et al.</i> (2003)	Analyse von DNA-Sequenzen hinsichtlich Restriktionsschnittstellen
Minitab® 16.1	Minitab GmbH, München, Deutschland	Statistische Auswertung
Reverse Complement	Stothard (2000)	Sequenzbearbeitung
SnapGene®	GSL Biotech LLC, Chicago, USA	Darstellung von Vektorkarten, virtuelle Klonierung
TAIR „The Arabidopsis Information Resource“	Swarbreck <i>et al.</i> (2008); Berardini <i>et al.</i> (2015)	Arabidopsis-Datenbank
T-DNA Express	Salk Institute Genomic Analysis Laboratory	Arabidopsis-Datenbank und Genkartierung

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

Für die Anzucht von *E. coli*-Zellen wurde LB-Medium (Luria/Miller) der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) genutzt, das je nach Bedarf vorgemischt mit Agar eingesetzt wurde. Zur Anzucht von *A. tumefaciens* wurde YEP-Medium verwendet. Für eine Selektion auf positive Transformanden wurden den Medien Antibiotika in den unten angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt (2.2.1.2).

YEP-Medium (Yeast Extract Peptone-Medium)

10 g Hefeextrakt

10 g Pepton

5 g NaCl

(für Festmedium: 15 g Agar)

ad 1 l H₂O

pH 7,0

2.2.1.2 Antibiotika

Antibiotika zur Selektion von Bakterien und Pflanzen wurden den Medien in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin 100 µg/ml → amp₁₀₀

Gentamycin 30 µg/ml → gent₃₀

Rifampicin 50 µg/ml → rif₅₀

Kanamycin 50 µg/ml → kan₅₀

Spectinomycin 100 µg/ml → spec₁₀₀

2.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 100 µl einer Zellsuspension mit 800 µl LB-Flüssigmedium gemischt und für eine Stunde bei 37°C und 400 rpm inkubiert. 10 - 20 µl der Suspension wurden auf LB-Festmedium ausgebracht und bei 37°C über Nacht angezogen. Am Folgetag wurden 5 ml LB-Flüssigmedium für eine Vorkultur mit einer über Nacht gewachsenen Einzelkolonie inokuliert und nochmals über Nacht bei 37°C und 400 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 ml LB-Flüssigmedium mit 300 µl Vorkultur angeimpft und die Suspension bei 37°C und 400 rpm bis zu einer optischen Dichte OD_{E550}

von 0,28 - 0,32 angezogen. Die Zellkultur wurde auf 4°C heruntergekühlt und für 5 min bei 5.000 x *g* und 4°C zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte bei 4°C. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Zellpellet in einem Gesamtvolumen von 80 ml Tfb I-Puffer resuspendiert und anschließend für 5 min auf Eis gehalten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min / 5.000 x *g* / 4°C) wurde der Überstand ebenfalls verworfen und das Pellet in einem Gesamtvolumen von 4 - 5 ml Tfb II-Puffer resuspendiert. Folgend wurden die Zellen in 210 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

TfB I (*Transformation buffer I*)

30 mM K-Acetat
 50 mM MnCl₂
 100 mM KCl
 10 mM CaCl₂
 15% (v/v) Glycerin
 (steril filtrieren)

TfB II (*Transformation buffer II*)

10 mM MOPS pH 7,0
 75 mM CaCl₂
 10 mM KCl
 15% (v/v) Glycerin
 (autoklavieren)

2.2.1.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Bei Transformationen von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde nach einer vorangegangenen Ligation (2.2.2.9) der gesamte Reaktionsansatz (oder 0,5 µl Plasmidlösung unbestimmter Konzentration bei Retransformationen) zu einem Aliquot kompetenter Zellen gegeben und das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 - 45 sec. Nachdem die Suspension für weitere 3 min auf Eis gehalten worden war, wurden 200 µl LB-Flüssigmedium hinzugegeben und der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37°C und 800 rpm auf einem Heizblock inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf LB-Festmedium, versetzt mit geeigneten Antibiotika (2.2.1.2), ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden Einzelkolonien in je 4 ml LB-Flüssigmedium, versetzt mit entsprechenden Antibiotika, überführt und für folgende Plasmidisolierungen (2.2.2.1) ebenfalls über Nacht bei 37°C und 400 rpm angezogen.

2.2.1.5 Herstellung chemisch kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Bevor eine stabile Transformation von *A. tumefaciens* durchgeführt werden konnte, wurden zunächst chemisch kompetente Zellen des Stamms GV3101 hergestellt. Zu diesem Zweck wurde je eine einzelne Bakterienkolonie über Nacht bei 28°C und 250 rpm in 2 ml YEP-Medium (gent₃₀/kan₅₀) angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml YEP-Medium (gent₃₀/kan₅₀) angeimpft und ebenfalls bei 28°C und 250 rpm über Nacht bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Nach einer Zentrifugation der Bakteriensuspension für 5 min bei 4°C und 5.000 x *g* wurde das Zellpellet in 10 ml 150 mM NaCl resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min / 4°C / 5.000 x *g*). Danach

wurden die Zellen in 1 ml eiskalter 20 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und in 200 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Bakterien konnten nun direkt zur Transformation (2.2.1.7) verwendet werden. Wurden die Zellen nicht sofort verwendet, wurde zusätzlich zu der CaCl₂-Lösung 15% (v/v) Glycerin zugefügt, die Zellsuspension in 200 µl große Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.6 Transformation chemisch kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *A. tumefaciens*-Zellen mit 1 µg Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nachdem die Zellen für 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren worden waren, wurden sie für 3 min bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und danach kurz auf Eis abgekühlt. Nun wurde 1 ml YEP-Medium hinzugefügt und die Zellsuspension 2 - 4 h bei 28°C und 250 rpm inkubiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 5.000 x *g* und Raumtemperatur wurde das Zellpellet in 200 µl YEP-Medium resuspendiert und auf YEP-Festmedium, versetzt mit entsprechenden Antibiotika, ausgebracht. Erfolgreich transformierte Zellen bildeten nach 2 - 3 Tagen bei einer Inkubationstemperatur von 28°C Einzelkolonien.

2.2.1.7 Stabile Transformation von Arabidopsis mit Hilfe von *A. tumefaciens*

Die stabile Transformation von Arabidopsis-Pflanzen erfolgte in Anlehnung an die *floral dip*-Methode (Clough & Bent, 1998). Es wurden circa 40 - 50 Individuen pro Transformationsversuch unter Langtagbedingungen auf Erde angezogen. Um möglichst viele Blütenstände zu erhalten, wurden die Primärfloreszenzen entfernt. Bei Erreichen einer Sprosslänge von circa 6 cm, wurden die Pflanzen für die Transformation verwendet. Am Vortag des Transformationsexperimentes wurden die Pflanzen gewässert.

Für die Transformation der Pflanzen wurden zwei Vorkulturen von frisch transformierten Bakterien (*A. tumefaciens* Stamm GV3101; 0) in 2 ml YEP-Medium, versetzt mit entsprechenden Antibiotika, über Nacht bei 28°C und 250 rpm angezogen. Mit den in den Vorkulturen verwendeten Kolonien wurden PCR-Reaktionen durchgeführt (2.2.2.4), um das Vorhandensein des eingesetzten Plasmids zu überprüfen. Hierauf wurde mit einer als positiv auf das erwünschte Plasmid nachgewiesenen Vorkultur weitergearbeitet, welche in 20 ml YEP-Medium (rif₅₀/gent₃₀/spec₁₀₀) überführt und abermals für 24 h bei 28°C und 250 rpm inkubiert wurde. Die gesamte Bakteriensuspension wurde im Anschluss in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4°C und 5.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml YEP-Medium mit 0,3 g Saccharose und 5 µl Silwet L77 resuspendiert.

Nach dem Entfernen bereits geöffneter Einzelblüten wurde die Bakteriensuspension mit einer Pipette großzügig auf alle ungeöffneten Blüten aufgetragen. Anschließend wurden die Pflanzen für 24 h unter einer Kunststoffhülle im Dunkeln gehalten und nachfolgend den

Standardbedingungen zur Anzucht ausgesetzt. Die Transformation wurde nach 5 - 7 Tagen wiederholt.

2.2.1.8 Herstellung von Gefrierkulturen

Zur Lagerung transformierter Bakterien (*E. coli* und *A. tumefaciens*; 2.2.1.4, 0) wurden je 800 µl Bakteriensuspension mit 200 µl Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Plasmid-DNA für Analysen, in denen die Reinheit der Proben nicht ausschlaggebend war, wurde folgendermaßen isoliert: Zunächst wurde eine Einzelkolonie, in die ein zu analysierendes Plasmid eingebracht worden war (2.2.1.4), über Nacht in 4 ml LB-Flüssigkultur mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C und 400 rpm angezogen. 2 ml der Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 2 min bei 16.000 x *g* und Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, 100 µl von Lösung I hinzugegeben und das Pellet resuspendiert. 200 µl von Lösung II wurden hinzugefügt und das Gemisch für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Folgend wurden 150 µl von Lösung III zügig hinzugefügt, die Probe gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 16.000 x *g* und Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 1 ml eiskaltes Ethanol absolut wurde zugegeben und der Ansatz gemischt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 16.000 x *g* und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen (5 min / 16.000 x *g* / Raumtemperatur). Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und das Pellet getrocknet, um Ethanolreste zu entfernen. Danach wurde das Pellet in 1x TE-Puffer gelöst und anschließend bei -20°C gelagert. Zur ersten grundlegenden Überprüfung der Korrektheit des Plasmids wurde dieses restringiert (2.2.2.7). Für eine saubere Aufreinigung von Plasmiden wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

Lösung I

25 mM Tris-HCl, pH 8,0
 10 mM EDTA
 50 mM Glucose
 frisch hinzu: RNase A (10 mg/ml) 300 µl / 10 ml

Lösung II

0,2 M NaOH
 1% (w/v) SDS

Lösung III

3 M Na-Acetat, pH 4,8 oder 5,0

2.2.2.2 Präparation von genomischer DNA aus Arabidopsis

Zur Genotypisierung (2.2.3.7) und Klonierung (2.2.2.9) wurde genomische DNA (gDNA) aus Rosettenblättern auf Erde angezogener Individuen isoliert. Dazu wurde ein mittelgroßes Rosettenblatt in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit 400 µl Extraktionspuffer überschichtet. Das Gewebe wurde durch Gebrauch von Mikropistillen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 16.000 x g und Raumtemperatur pelletiert. 300 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol für 5 min bei 16.000 x g und Raumtemperatur gewaschen. Das Ethanol wurde verworfen und das Pellet zur vollständigen Entfernung des Ethanols getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer gelöst und ohne weitere Bestimmung des DNA-Gehalts 1 µl der DNA-Lösung pro PCR eingesetzt (2.2.2.3). Die Aliquots wurden bei 4°C gelagert.

Extraktionspuffer

200 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 250 mM NaCl
 25 mM EDTA
 0,5% (w/v) SDS

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA

2.2.2.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten über Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten über die PCR-Methode wurden verschiedene Polymerasesysteme genutzt. Das DreamTaq™ Green-System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) wurde für RT-PCR-Analysen (2.2.2.14) und Genotypisierungen (2.2.3.7) eingesetzt. Bei der Amplifikation von Gensequenzen, die bei Klonierungen eingesetzt werden sollten, kam eine *Pfu* Polymerase (M. Sauter, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland) mit zugehörigem Puffer zum Einsatz. Konnte mit dieser kein Amplifikat erhalten werden, kamen die Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) oder das Expand Long™ Template PCR System (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz. Die PCRs wurden in 20 µl- oder 50 µl-Ansätzen in

einem *Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) durchgeführt und setzten sich folgendermaßen zusammen:

DreamTaq™ DNA Polymerase

circa 1 ng - 1 µg Template-DNA
 0,5 mM dNTP-Mix
 0,5 µM 5'-Primer
 0,5 µM 3'-Primer
 0,25 U DreamTaq™ Polymerase
 2 µl 10x DreamTaq™ Green Buffer
 ad 20 µl H₂O

Pfu Polymerase

circa 1 ng - 1 µg Template-DNA
 0,5 mM dNTP-Mix
 0,5 µM 5'-Primer
 0,5 µM 3'-Primer
 1 U Pfu Polymerase
 2 µl 10x Pfu Polymerase Puffer
 ad 20 µl H₂O

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase

circa 50 ng - 250 ng Template-DNA
 0,5 mM dNTP-Mix
 0,5 µM 5'-Primer
 0,5 µM 3'-Primer
 1 U Phusion™ High-Fidelity Polymerase
 10 µl 5x Phusion™ HF Buffer
 ad 50 µl H₂O

Expand Long™ Template Enzyme Mix

circa 0,5 µg - 1 µg Template-DNA
 0,35 mM dNTP-Mix
 0,3 µM 5'-Primer
 0,3 µM 3'-Primer
 3,75 U Expand Long™ Template Enzyme Mix
 5 µl 10x Buffer I (für 0,5 - 9 kb Amplifikate)
 ad 50 µl H₂O

Die jeweiligen PCR-Programme für die unterschiedlichen Polymerasesysteme wurden entsprechend den Herstellerangaben ausgewählt und optimiert. Für die *Pfu* Polymerase wurden die Anlagerungstemperaturen zwischen 45°C und 63°C in Abhängigkeit von den verwendeten Primern und deren Übereinstimmung mit ihrer Zielsequenz gewählt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des erwarteten Amplifikats. Grundsätzlich wurde davon ausgegangen, dass die *Pfu* Polymerase mindestens 500 Basen pro Minute umsetzen kann. Die Zyklenanzahl betrug 20 - 35 Zyklen.

PCR-Programm, Pfu Polymerase

initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	50 sec) ___ Zyklen
Anlagerung	___°C	50 sec	
Elongation	72°C	___ sec	
abschließende Elongation	72°C	5 min	

10x Pfu Polymerase Puffer

200 mM Tris-HCl, pH 8,8

100 mM (NH₄)₂SO₄

100 mM KCl

1 mg/ml BSA

1% (v/v) Triton®X-100

20 mM MgSO₄

Nach Beendigung der Amplifikation wurden die Proben entweder direkt durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt oder bei -20°C gelagert. Abweichungen von diesem Protokoll sind im weiteren Verlauf aufgeführt.

2.2.2.4 Kolonie-PCR

Nach einer *A. tumefaciens*-Transformation (2.2.1.5) wurden die transformierten Zellen über Kolonie-PCR mit der DreamTaq™ Polymerase auf das Vorhandensein des eingesetzten Plasmids geprüft. Hierzu wurden Zellen einer Agrobakterienkultur mit einer Pipettenspitze direkt vom YEP-Festmedium in den PCR-Reaktionsansatz (2.2.2.3) überführt.

2.2.2.5 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Eine größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Anwendung der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989). Die zu analysierende DNA wurde mit einem 5x Probenpuffer versetzt. Zur Auftrennung von PCR-Amplifikaten bei Einsatz der DreamTaq™ Polymerase (2.2.2.3) wurden die Proben nicht mit zusätzlichem Probenpuffer versetzt. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden die 0,8 - 2%igen Agarose-TAE-Gele mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Ergebnisse wurden an einer Geldokumentationsanlage festgehalten.

5x DNA-Probenpuffer für Agarosegele

50% (v/v) Glycerin

0,1% (w/v) Bromphenolblau

10 mM Tris-HCl pH 8,0

50x TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat

2 mM EDTA

pH 8,0

2.2.2.6 DNA-Elution

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) nach Herstellerangaben in einem Mindestvolumen von 30 µl durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.2.2.7 DNA-Restriktion mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA-Fragmenten wurde unter Anwendung klassischer Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) durchgeführt. Es wurden standardmäßig circa 1 - 2 µg DNA mit je 1 U Enzym pro µg DNA in einem passenden Puffersystem restringiert.

2.2.2.8 Dephosphorylierung

Das Entfernen von Phosphatresten an den 5'-Enden restringierter Vektoren (2.2.2.7) zum Verhindern einer Religation der DNA wurde mit Hilfe der alkalischen Phosphatase FastAPTM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktion erfolgte über 1 h bei 37°C. Die Inaktivierung der thermosensitiven Phosphatase wurde über 10 min bei 75°C erreicht.

2.2.2.9 Ligation und GatewayTM-Rekombinationsklonierung

Zur Ligation von Restriktionsprodukten (2.2.2.7) in den ebenfalls restringierten und dephosphorylierten (2.2.2.8) Klonierungsvektor pENTRTM1A Dual Selection Vector (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem 20 µl-Ansatz mit einem dreifachen Überschuss des zu klonierenden Fragments in Relation zum Zielvektor und 5 U Enzym für 3 h bei Raumtemperatur. Zum Transfer der zu klonierenden Sequenz vom Klonierungsvektor in den Ziel-/Überexpressionsvektor (pB7WG2.0, Karimi *et al.*, 2002) wurde das InvitrogenTM GatewayTM Rekombinationsklonierungssystem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) nach Herstellerangaben genutzt.

2.2.2.10 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Sequenzrichtigkeit von Klonierungsprodukten (2.2.2.9) wurden Sequenzierungen von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

2.2.2.11 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen wurde zunächst das jeweilige Pflanzenmaterial in 1,5 ml-Gefäße geerntet, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei Bedarf bei -80°C bis zur Isolierung der RNA gelagert. Zur Isolierung wurden die Proben auf Eis gehalten, 500 µl TRI Reagent[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und das Material mit Hilfe von Mikropistillen aufgeschlossen. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min,

nach welcher $\frac{1}{5}$ Volumen Chloroform hinzugegeben und der Probenansatz einige Male invertiert wurde. Nach einer weiteren 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 min bei 12.000 x *g* und 4°C zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits je $\frac{1}{4}$ Volumen Isopropanol und High-Salt-Solution vorgelegt worden waren. Danach wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min bei 12.000 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol nach kurzem mischen auf einem Vortexgerät bei 12.000 x *g* und 4°C für 5 min gewaschen. Das Ethanol wurde entfernt, das Pellet für circa 2 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 43 µl Wasser (*aqua bidest*, autoklaviert) resuspendiert. Um die RNA zu lösen, wurden die Proben bei 60°C für 10 min bei 1.000 rpm gemischt. Eine Zwischenlagerung der RNA vor dem folgenden DNase-Verdau erfolgte bei -20°C oder -80°C.

High-Salt-Solution

0,8 M Natriumcitrat

1,2 M NaCl

2.2.2.12 DNase-Verdau

Zur Entfernung restlicher DNA-Fragmente wurde zu den aus der RNA-Isolation erhaltenen 43 µl RNA-Lösung (2.2.2.11) 5 µl 10x DNase-Puffer und 2 U RNase-freie DNase I (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung des Enzyms erfolgte eine Phenol-Chloroform-Fällung der RNA (2.2.2.13).

2.2.2.13 Phenol-Chloroform-Fällung von RNA

Zur Entfernung der DNase I aus den RNA-Proben (2.2.2.12) wurde der 50 µl-Ansatz durch Zugabe von Wasser (*aqua bidest*, autoklaviert) auf ein Volumen von 100 µl gebracht und folgend 1 Volumen Phenol:Chloroform (Verhältnis 2:1) hinzugefügt und gemischt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 12.000 x *g* und 4°C. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das bereits 1 Volumen Chloroform vorgelegt worden waren. Der Ansatz wurde gemischt und für 1 min bei 12.000 x *g* und 4°C zentrifugiert. Erneut wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das 2,5 Volumen eiskaltes Ethanol_{abs} und 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) vorgelegt worden waren. Die Fällung der RNA erfolgte für 1 h bei -20°C. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12.000 x *g* und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol bei 12.000 x *g* und 4°C für 5 min gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet für 2 - 3 min bei Raumtemperatur getrocknet, um restliches Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde es in 20 - 40 µl autoklaviertem Wasser (*aqua bidest*, autoklaviert) aufgenommen und für 10 min bei 1.000 rpm und 60°C inkubiert. Die

Bestimmung der Konzentration erfolgte in einem 2 µl-Volumen am NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) und die Integrität wurde mit je 1 µg RNA in einem 1%igen Agarosegel überprüft (2.2.2.5). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C oder -80°C. Es folgte die Umschreibung der RNA in cDNA über eine reverse Transkription (2.2.2.14).

2.2.2.14 Reverse Transkriptase-Reaktion und RT-PCR

Die Umschreibung von RNA zu cDNA durch Nutzung einer reversen Transkriptase (RT) erfolgte in einem 20 µl-Ansatz mit einem Einsatz von je 1 µg RNA. Es wurden 0,5 µl oligo-dT-Primer (0,5 µg/µl; 1:1:1 dT₁₄:dT₁₆:dT₁₈) und 1 µl dNTPs (10 mM Stammlösung) sowie 4 µl 5x RT-Puffer und 100 U RevertAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) hinzugefügt und dieser Reaktionsansatz für 50 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 15 min bei 70°C inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Zur Vervielfältigung der cDNA aus der reversen Transkription, wurde je Ansatz 1 µl cDNA (cDNA aus circa 50 ng umgeschriebener RNA) in eine PCR eingesetzt. Die cDNA wurde in dieser Arbeit zur Analyse der Expressionsstärke von Überexpressions- und T-DNA-Insertionslinien (2.2.3.6, 2.2.3.7) in unterschiedlichen Geweben genutzt, in der quantitativen Realtime-PCR (2.2.2.15) verwendet und für Klonierungsprojekte eingesetzt.

2.2.2.15 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Zur Durchführung quantitativer Realtime-PCRs (qRT-PCRs) wurde zunächst Gesamt-RNA isoliert (2.2.2.11) und die mRNA in cDNA umgeschrieben (2.2.2.14). Zur Überprüfung der Expressionsunterschiede verschiedener Gene wurden standardisierte Primer verwendet, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Diese Primer sollten aus 20 - 22 Oligonukleotiden bestehen, die Schmelztemperatur (T_M) bei 58 - 62°C mit einer maximalen Temperaturdifferenz von 2°C liegen und das Amplifikat eine Länge von circa 115 - 135 bp aufweisen. Um diese Vorgaben einhalten zu können, wurde das Programm Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA) verwendet. Bestenfalls sollte das Primerpaar im Bereich zweier Exons liegen, die eine Intronsequenz einschließen, sodass eine Verunreinigung mit gDNA leicht zu identifizieren wäre. Zusätzlich sollten die Primer möglichst nicht selbstkomplementär sein und einen zugehörigen Wert von 2 - 6 aufweisen.

Zunächst wurden die Primer in einer RT-PCR-Analyse (2.2.2.14) und zum Vergleich mit gDNA als Template auf ihre Spezifität getestet. Es folgte die Überprüfung der für die qRT-PCR synthetisierten cDNA auf gDNA-Verunreinigungen und ihre Intaktheit durch Anwendung einer Aktin-PCR (2.2.2.3) mit den Primern ACT2 for und ACT2 rev (Anhang, Tabelle 11). Nach Abschluss der Vorversuche folgte die eigentliche qRT-PCR. Diese wurde mit Hilfe des Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) in

einem Rotor-Gene® Q Gerät (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt und mit dem zugehörigen Programm Rotor-Gene® Q Version 2.3.1.49 dokumentiert. Bei dem Kit handelt es sich um eine Reaktionsausstattung zur Anwendung von 2-Schritt-PCRs ohne getrennte Anlagerungs- und Elongationsschritte. Jede Versuchsreihe wurde mit cDNA aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und für jedes dieser biologischen Replikate je zwei technische Wiederholungen innerhalb eines qRT-PCR-Versuchs durchgeführt. In jeden Reaktionsansatz wurden 2 µl cDNA eingesetzt, die zuvor in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt worden war (cDNA aus circa 10 ng umgeschriebene RNA).

Rotor-Gene SYBR® Green PCR-Ansatz

2 µl Template-cDNA (1:10 verdünnt, entspricht circa 4 ng cDNA)

1 µM 5'-Primer

1 µM 3'-Primer

7,5 µl Rotor-Gene SYBR® Green PCR Master Mix

ad 15 µl H₂O RNase-frei

2-Schritt-qRT-PCR-Programm

initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	5 sec	↷ 40 - 45 Zyklen
Anlagerung & Elongation	60°C	10 sec	
Schmelzpunktbestimmung			

Nach der Durchführung der qRT-PCR wurde diese ausgewertet. Zunächst wurden die Schmelzpunktkurven der einzelnen Proben betrachtet, um mögliche Verunreinigungen der Wasserkontrollen ausschließen und die Anwesenheit von Amplifikaten überprüfen zu können. Der Ct-Wert und die Primereffizienz wurden automatisch im Programm (Rotor-Gene® Q 2.3.1.49) bestimmt und dienen der Berechnung der Expressionsunterschiede der einzelnen Gene unter Anwendung folgender Formel:

$$\frac{\text{Effizienz Gen}^{(\text{Ct Gen Kontrolle} - \text{Ct Gen Behandlung})}}{\sqrt{\text{Effizienz ACT2}^{(\text{Ct ACT2 Kontrolle} - \text{Ct ACT2 Behandlung})} \cdot \text{Effizienz GAPC}^{(\text{Ct GAPC Kontrolle} - \text{Ct GAPC Behandlung})}}}$$

Diese ist angelehnt an die $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode und schließt in der Berechnung die Primereffizienz zweier Referenzgene ein (Pfaffl, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002). Zur Normalisierung der Expressionsdaten dienen die Referenzgene *ACT2* (*ACTIN2*) und *GAPC* (*GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE*). Die aus dieser Berechnung erhaltenen Werte wurden aus den drei unabhängigen biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten pro Lauf gemittelt. Die Expressionsdaten des Wildtyps unter Kontrollbedingungen wurden je Versuch auf den Wert 1 gesetzt und alle anderen Werte als Vielfache dessen berechnet und als relative Expression gezeigt.

2.2.3 Arbeiten mit Pflanzenmaterial

2.2.3.1 Anzucht von Arabidopsis auf Erde

Arabidopsis-Pflanzen wurden auf einem Erde-Sand-Gemisch (Einheitserde:Sand, 2:1) angezogen. Das Saatgut wurde zunächst bei 4°C für zwei Tage im Dunkeln stratifiziert um anschließend in Klimakammern unter Langtagbedingungen angezogen zu werden. Die Anzucht erfolgte bei einer Temperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% bei einem Zyklus von 16 h Licht ($70 \mu\text{M Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und 8 h Dunkelheit.

2.2.3.2 Kreuzen von Arabidopsis

Um Arabidopsis-Pflanzen zu kreuzen, wurden zunächst die Antheren aus ungeöffneten Blüten (Stadium 12 nach Alvarez-Buylla *et al.* (2010)) entfernt, um eine Selbstbestäubung zu verhindern. Folgend wurde das Pistill freigelegt und mit reifem Pollen des Kreuzungspartners sofort und ein weiteres Mal nach 24 h bestäubt. Das Anhaften des Pollens wurde am Binokular überprüft.

2.2.3.3 Selektion von Arabidopsis mit BASTA®

Transformanten (T_1 -Generation) und T-DNA-Insertionslinien, die über eine entsprechende Resistenz verfügen sollten, wurden mit Hilfe von BASTA® selektiert. Hierzu wurde eine 225 μM BASTA®-Lösung auf Keimlinge im Kotyledonenstadium, die auf Erde angezogen worden waren, mit einem Zerstäuber gesprüht. Die auf eine BASTA®-Resistenz als positiv getesteten Transformanten wurden bis zur Samenreife angezogen und die folgende (T_2 -Generation) erneut mit BASTA® selektiert. Das aus dieser Generation gebildete Saatgut (T_3 -Generation) wurde darauf getestet, ob bei einer erneuten BASTA®-Selektion ausschließlich BASTA®-resistente Keimlinge als Filialgeneration einer einzelnen Pflanze nachgewiesen werden konnten. War dies der Fall, wurde davon ausgegangen, dass die Integration des Gens oder der T-DNA homozygot vorhanden war oder zumindest in jeder aus diesem Saatgut entstehenden Pflanze eine Integration des eingebrachten Konstrukts vorhanden sein würde. Dieses Saatgut wurde auf eine Expressionsveränderung des jeweiligen zu analysierenden Gens überprüft (2.2.3.6, 2.2.3.7) und für weitere Analysen eingesetzt.

2.2.3.4 Sterile Anzucht von Arabidopsis

Um Arabidopsis-Pflanzen unter sterilen Bedingungen anziehen zu können, wurde zunächst das Saatgut sterilisiert. Dazu wurden die Samen für 25 min bei 1.400 rpm mit einer 2%igen Natriumhypochloridlösung behandelt und anschließend viermal mit autoklaviertem Wasser

gewaschen. Anschließend wurden die Samen mit einer 20 µl-Pipette, eingestellt auf ein 3 µl-Volumen, einzeln auf ½x MS-Festmedium gegeben.

Das ½x MS-Festmedium (Murashige-Skoog-Medium, *medium basal salt solution*, Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande), versetzt mit 1% Saccharose, wurde wie folgt hergestellt: Eine 0,8%ige Gelritelösung (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande) wurde zum Sieden gebracht und in einem Verhältnis von 2:1 mit erwärmtem 1x konzentriertem, sterilfiltrierten MS-Medium, versetzt mit 2% Saccharose, gemischt. Das MS-Medium war zuvor bei Bedarf mit Mannitol, Sorbitol oder NaCl versetzt worden. Abscisinsäure (ABA) und/oder Phytosulfokin (PSK) wurden bei Bedarf, nach Abkühlen des Gemisches auf circa 45-55°C, hinzugegeben. Ein Volumen von je 50 ml des jeweiligen Gemisches wurde in quadratische Petrischalen (12 x 12 cm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Nach 2 Tagen Stratifizierung bei 4°C im Dunkeln wurden die Petrischalen mit dem enthaltenen Saatgut in Klimakammern überführt, vertikal mit einem Winkel von circa 70° ausgerichtet und unter Langtagbedingungen angezogen. Abweichungen sind im weiteren Verlauf erläutert.

Zusätze für ½x MS-Medium

25 - 350 mM Mannitol

25 - 200 mM Sorbitol

1 - 5 µM Abscisinsäure (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande)

1 µM Phytosulfokin (Pepscan, Lelystad, Niederlande)

2.2.3.5 Selektion von Arabidopsis mit Kanamycin

Die Selektion von T-DNA-Insertionslinien, die über eine Kanamycin-Resistenz verfügten, erfolgte unter sterilen Bedingungen, ähnlich der zuvor beschriebenen Anzucht (2.2.3.4). Das verwendete Medium setzte sich aus ½x MS-Medium mit 1% Saccharose (w/v) zusammen und wurde mit 1% Agar (w/v; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verfestigt. kan₅₀ wurde in das noch flüssige Medium bei einer Temperatur von circa 45 - 50°C hinzugegeben. Um Kanamycin-resistente Pflanzen eindeutig identifizieren zu können, wurde zusätzlich zum transgenen Saatgut Wildtypsaatgut ausgelegt. Auf eine Resistenz positiv getestete Pflanzen wurden vom Medium auf Erde überführt und weiter bis zur Samenreife angezogen.

2.2.3.6 Nachweis einer Überexpression

Bei einem Test auf eine mögliche Überexpression eines Gens wurde BASTA®-resistentes T₃-Saatgut steril auf ½x MS-Festmedium ausgelegt (2.2.3.4), aus fünf Tage alten Keimlingen Gesamt-RNA isoliert und diese über eine transkriptspezifische RT-PCR-Analyse (2.2.2.14, 2.2.3.6) auf eine Überexpression des jeweiligen Gens untersucht. Eine Liste der verwendeten Primer ist dem Anhang (Tabelle 11) zu entnehmen, als Kontrollgen diente *ACTIN2*.

2.2.3.7 Untersuchung von T-DNA-Insertionslinien auf eine Transkriptreduktion

Bei einer Analyse von T-DNA-Insertionslinien wurde zunächst genomische DNA isoliert (2.2.2.2) und diese genotypisiert, also auf eine homozygote T-DNA-Integration getestet. Dies geschah mit zwei unabhängigen PCRs, wobei in der einen ein Primerpaar verwendet wurde, das vor und hinter der vorhergesagten Integration binden sollte um Wildtypallele nachweisen zu können und das andere auf der *left border* der T-DNA und auf dem zu untersuchenden Gen. Bei einer homozygoten Integration wurden die Pflanzen wie bei einem Test auf eine Überexpression auf ½x MS-Medium angezogen und wie oben angegeben fortgefahren (2.2.3.6). War der Test auf eine homozygote Integration auf genomischer Ebene nicht möglich, wurde je nach Lokalisation der verwendeten Primer ein anderes Primerpaar getestet, da die Vorhersage der genauen Lokalisation der T-DNA-Integration nicht vollkommen verlässlich ist. War auch mit einem anderen Primerpaar kein Nachweis möglich, wurde das Saatgut durch BASTA®- oder Kanamycin-Behandlung (2.2.3.3, 2.2.3.5), falls/wenn eine Resistenz vorhanden war, selektiert und folgend auf Transkriptebeine auf eine Reduktion der Expressionsstärke hin analysiert.

2.2.4 Physiologische Versuchsmethoden

2.2.4.1 Anzucht zur Quantifizierung der Wurzellänge in Abhängigkeit von PSK

Die Untersuchung der Unterschiede von Wurzellängen durch Zugabe von PSK im Vergleich zu Kontrollbedingungen wurde mit der ImageJ 1.46r Software (Schindelin *et al.*, 2012) quantifiziert und erfolgte an fünf Tage alten, steril und vertikal ausgerichtet angezogenen Keimlingen (2.2.3.4).

2.2.4.2 Anzucht zur Quantifizierung des Sprossgewichts bei osmotischen Stressbedingungen

Zur Untersuchung von Unterschieden im Sprossgewicht in Abhängigkeit von der Zugabe von Mannitol und Sorbitol wurden Arabidopsis-Pflanzen zunächst für 4 Tage ohne Zusätze unter sterilen Bedingungen und vertikal orientiert angezogen (2.2.3.4). Die Keimlinge wurden anschließend auf Medium mit Mannitol oder Sorbitol in unterschiedlichen Konzentrationen transferiert und für weitere 21 Tage angezogen. Das Sprossfrischgewicht wurde an der Feinwaage bestimmt.

2.2.4.3 Anzucht zur Quantifizierung der Lateralwurzel- und Primordiendichte bei osmotischen Stressbedingungen

Für die Quantifizierung der Lateralwurzel- und Primordiendichte von Primärwurzeln wurden Arabidopsis-Pflanzen zunächst für 4 Tage ohne Zusätze unter sterilen Bedingungen und vertikal orientiert auf $\frac{1}{2}$ x MS-Medium angezogen (2.2.3.4). Folgend wurden die Pflanzen auf Medium, das im Vergleich zu den Kontrollbedingungen mit 200 mM Mannitol versetzt worden war, transferiert und für weitere 7 Tage angezogen. Die Bestimmung der Dichte der lateralen Wurzelorgane erfolgte in Abhängigkeit zur Gesamtlänge der Primärwurzel.

2.2.4.4 Anzucht zur Quantifizierung der Keimungsrate und des Ergrürens von Kotyledonen bei osmotischen Stressbedingungen, ABA- und PSK-Behandlung

Saatgut, bei dem die Keimungsrate und das Ergrünen der Kotyledonen unter Zugabe von Abscisinsäure oder Mannitol bestimmt werden sollten, wurde auf Medium ausgelegt, dem im Vergleich zu den Kontrollbedingungen 1 μ M ABA oder 350 mM Mannitol (und/oder 1 μ M PSK) zugesetzt worden war/en (2.2.3.4). Es folgte eine dreitägige Stratifizierung und eine weitere Anzucht unter Langtagbedingungen für 21 Tage in horizontaler Ausrichtung mit fortwährender Quantifizierung der Keimungsereignisse und der Anzahl von Keimlingen mit ergrüneten Kotyledonen.

2.2.5 Anfertigung von Präparaten zur Mikroskopie

2.2.5.1 GUS-Färbung

Zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität stabil transformierter Arabidopsis-Pflanzen (Anhang, Tabelle 15) wurden die zu untersuchenden Individuen mit X-Gluc-Färbelösung überschichtet und für 6 - 24 h bei 37°C in der Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Überführen der Keimlinge in 90%iges (v/v) Aceton gestoppt. Um das Chlorophyll anschließend zu entfernen, wurden die Proben bis zur vollständigen Entfärbung in 70% (v/v) Ethanol inkubiert und weiterhin bei 4°C oder Raumtemperatur gelagert. Die Proben wurden zur Dokumentation und mikroskopischen Untersuchung auf Objektträgern mit einer Klärlösung überschichtet, um die Zellwände lichtdurchlässiger zu machen. Ein weiterer Vorteil der Anwendung dieser Lösung ist eine vorübergehende Konservierung der Präparate.

X-Gluc-Lösung

100 mg X-Gluc (Cyclohexylammoniumsalz der 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronsäure; Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande)

in 1 ml Dimethylformamid

X-Gluc-Färbepuffer

50 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,0

0,5 mM Kalium-Ferrocyanid

0,5 mM Kalium-Ferricyanid

10 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)

0,1% (v/v) TritonTM X-100 (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Für die Herstellung gebrauchsfertiger X-Gluc-Färbelösung wurde 1 ml X-Gluc-Lösung zu 200 ml X-Gluc-Färbepuffer gegeben.

Klärlösung für Pflanzenmaterial

6 Teile Chloralhydrat

2 Teile Wasser

1 Teil Glycerin

3 Ergebnisse

3.1 Der PSK-Signalweg reguliert den ABA-Metabolismus und verstärkt die osmotische Stressresistenz

Der PSK-vermittelte Wachstumseffekt durch Zellelongation steht in Abhängigkeit zum Wasserinflux in die Zelle (Stührwohldt *et al.*, 2011; Cosgrove, 2014). Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, inwiefern der PSK-Signalweg in die pflanzliche Antwort auf osmotischen Stress eingebunden sein könnte.

3.1.1 PSKR1 unterstützt das Sprosswachstum bei osmotischem Stress

Es wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss die Abwesenheit der PSK-Rezeptoren, also eine Unterbrechung des PSK-Signalwegs, auf das Wachstum der Pflanze unter osmotischen Stressbedingungen hat. Hierzu wurden vier Tage alte, steril angezogene Keimlinge, auf Medium transferiert, das Mannitol als Osmotikum in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt (Abbildung 4). Das Wachstum des Wildtyps wurde mit dem der PSK-Rezeptor-Doppel-T-DNA-Insertionslinie *pskr1-3 pskr2-1* unter osmotischem Stress, durch Quantifizierung des Sprossfrischgewichts, verglichen. Eine Reduktion des Sprosswachstums war in dem gewählten Versuchsaufbau sowohl für den Wildtyp als auch für die untersuchte Mutante zu beobachten. Der Versuch zeigte, dass bei der Abwesenheit funktionsfähiger PSK-Rezeptoren in *pskr1-3 pskr2-1* ein geringeres Sprosswachstum unter osmotischem Stress im Vergleich zum Wildtyp stattfand (Abbildung 4 A). Dieser Wachstumsunterschied war bereits bei einer Konzentration von 25 mM Mannitol mit einer Differenz von 22% statistisch signifikant (Abbildung 4 D). Bis 50 mM gelten Mannitolkonzentrationen als gering und rufen schwachen osmotischen Stress hervor, wohingegen Konzentrationen ab 150 mM Mannitol als hoch gelten und starken osmotischen Stress induzieren (Zhu *et al.*, 1998; Claeys *et al.*, 2014; Van den Broeck *et al.*, 2017). Für weitere Analysen wurde eine Konzentration von 50 mM Mannitol ausgewählt, da hier der Unterschied des Sprossgewichts mit 40% am stärksten war. Die Reduktion des Sprossfrischgewichts von *pskr1-3 pskr2-1* manifestierte sich vorrangig durch eine Verringerung der Blattoberfläche und nicht der Blattanzahl (Abbildung 4 B, C). Durch eine Behandlung mit Sorbitol als einem alternativen Osmotikum (Anhang Abbildung 61, Seite 180) konnten die Ergebnisse bestätigt werden. Auch hier war eine stärkere Reduktion des Sprossgewichts der Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Daraus wurde geschlossen, dass einer oder beide PSK-Rezeptoren die osmotische Stressresistenz unterstützen.

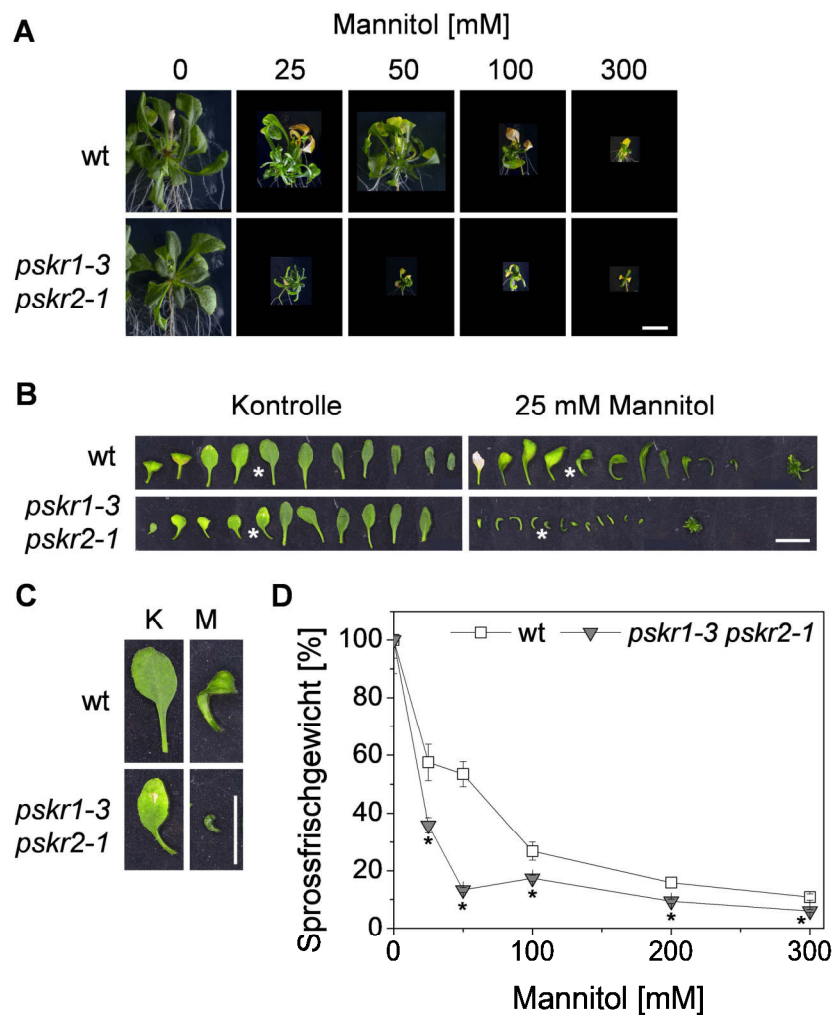


Abbildung 4: PSK-Rezeptoren vermitteln verstärkte Resistenz gegen osmotischen Stress.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Mannitol transferiert und nach weiteren 21 Tagen Anzucht analysiert. Es wurde *pskr1-3 pskr2-1* im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Messbalken 10 mm.

A Sprossphänotyp von *pskr1-3 pskr2-1* verglichen mit dem Wildtyp. Die Bilder wurden mit einem schwarzen Hintergrund versehen um den Größenvergleich zu vereinfachen.

B Veränderung der Blattmorphologie bei Behandlung mit 25 mM Mannitol. Asterisken markieren die Blätter, die in C vergrößert dargestellt sind.

C Phänotyp des fünften echten Blattes bei Behandlung mit 25 mM Mannitol. (Vergrößerung aus B) K: Kontrolle, M: 25 mM Mannitol.

D Sprossfrischgewicht (\pm SE) von *pskr1-3 pskr2-1* im Vergleich zum Wildtyp in Antwort auf Mannitol, gezeigt als prozentualer Anteil der unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen, deren Wert auf 100% gesetzt wurde. Asterisken zeigen statistisch signifikante Gewichtsunterschiede zwischen Wildtyp und *pskr1-3 pskr2-1* bei derselben Behandlung an (Mann-Whitney *U* Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 18$).

Um differenzieren zu können, welcher der PSK-Rezeptoren das Sprosswachstum unter osmotischem Stress unterstützt, wurden sowohl *pskr1-3*- als auch *pskr2-1*-Pflanzen analysiert (Abbildung 5). Der Verlust von PSKR1 führte zum gleichen Phänotyp unter osmotischem Stress wie die Abwesenheit beider Rezeptoren (Abbildung 5 A). Bei einem Verlust von PSKR2 war keine verstärkte Reduktion des Sprosswachstums im Vergleich zum Wildtyp erkennbar (Abbildung 5 B). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass PSKR1 und nicht PSKR2 die PSK-rezeptorabhängige Antwort auf osmotischen Stress im Spross vermittelt. Eine Überexpression von *PSKR1* zeigte keine veränderte Wachstumsreaktion der

Sprosses in Antwort auf Mannitol im Vergleich zum Wildtyp (Anhang Abbildung 62, Seite 180).

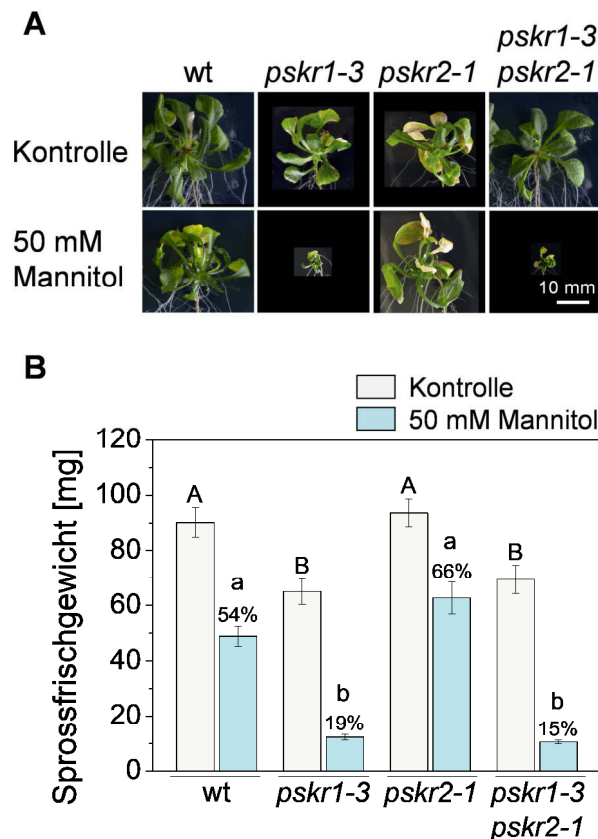


Abbildung 5: Osmotische Stressresistenz wird durch PSKR1 unterstützt.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war, und nach weiteren 21 Tagen Anzucht analysiert. Es wurden *pskr1-3*-, *pskr2-1*- und *pskr1-3 pskr2-1*-Pflanzen analysiert.

A Sprossphänotyp der T-DNA-Insertionslinien verglichen mit dem Wildtyp. Die Bilder wurden mit einem schwarzen Hintergrund versehen um den Größenvergleich zu vereinfachen.

B Sprossfrischgewicht (\pm SE) der T-DNA-Insertionslinien verglichen mit dem Wildtyp in Antwort auf Mannitol, Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Sprossfrischgewichts unter Kontrollbedingungen. Bei der Mannitolbehandlung erzielte Daten wurden als prozentualer Anteil des Sprossfrischgewichts der jeweiligen Linie unter Kontrollbedingungen berechnet und die statistischen Unterschiede mit Kleinbuchstaben dargestellt (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 18$).

3.1.2 PSKR1-Expressionsinduktion bei osmotischem Stress

Da durch physiologische Experimente nachgewiesen wurde, dass PSKR1 das Sprosswachstum unter osmotischem Stress erhält, wurde mit der Datenbank Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008) überprüft, ob der PSK-Signalweg durch osmotischen Stress beeinflusst wird. Die PSK-Rezeptorgene wurden auf eine Expressionsänderung unter osmotischem Stress und in Anwesenheit des Stresshormons ABA untersucht (Tabelle 4). Für *PSKR1* war eine leichte Induktion der Expression um 13,8% bei osmotischem Stress im Spross sichtbar, jedoch nicht in der Wurzel. Für *PSKR2* war keine Expressionsveränderung

außerhalb von +/-10% vorhanden. Für beide Rezeptoren wurde keine Veränderung der Expression in Antwort auf ABA detektiert.

Tabelle 4: Gene des PSK-Signalweges werden durch osmotischen Stress und ABA in ihrer Expression reguliert.

Aufgeführt sind die Expressionsänderungen der PSK-Rezeptor- und der PSK-Gene bei osmotischem Stress und in Antwort auf ABA, entnommen aus der Datenbank Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008), dargestellt als prozentuale Veränderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Originaldaten sowie eine Aufschlüsselung, um welche verwendeten Daten es sich handelt, sind dem Anhang (Tabelle 16, Seite 181) zu entnehmen. blau: induziert, orange: reprimiert, grau: nicht reguliert.

Familie	Gen-bezeichnung	Genlokus	osmotischer Stress Spross	osmotischer Stress Wurzel	ABA	Expressions-änderung [%]
PSKR	<i>PSKR1</i>	At2g02220	13,8	2,6	2,1	25,0
	<i>PSKR2</i>	At5g53890	4,4	-3,2	-3,5	20,0
PSK	<i>PSK1</i>	At1g13590	1,8	-10,6	-0,7	15,0
	<i>PSK2</i>	At2g22860	24,2	22,3	-7,7	10,0
	<i>PSK3</i>	At3g44735	0,0	-16,9	5,9	5,0
	<i>PSK4</i>	At3g49780	15,6	3,2	-13,0	0,0
	<i>PSK5</i>	At5g65870	10,4	10,8	-1,0	-5,0
						-10,0
						-15,0
						-20,0

Über GUS-Reporterlinien wurde untersucht, ob und in welchen Geweben sich das Expressionsmuster der PSK-Rezeptoren bei osmotischem Stress verändert. Veränderungen des Expressionsmusters konnten nach 24 Stunden Behandlung mit Mannitol von fünf Tage alten Keimlingen beobachtet werden (Abbildung 6). Die Änderung der Promotoraktivität war in den ersten echten, also jungen, sich entwickelnden Blättern zu beobachten (Abbildung 6, Pfeil).

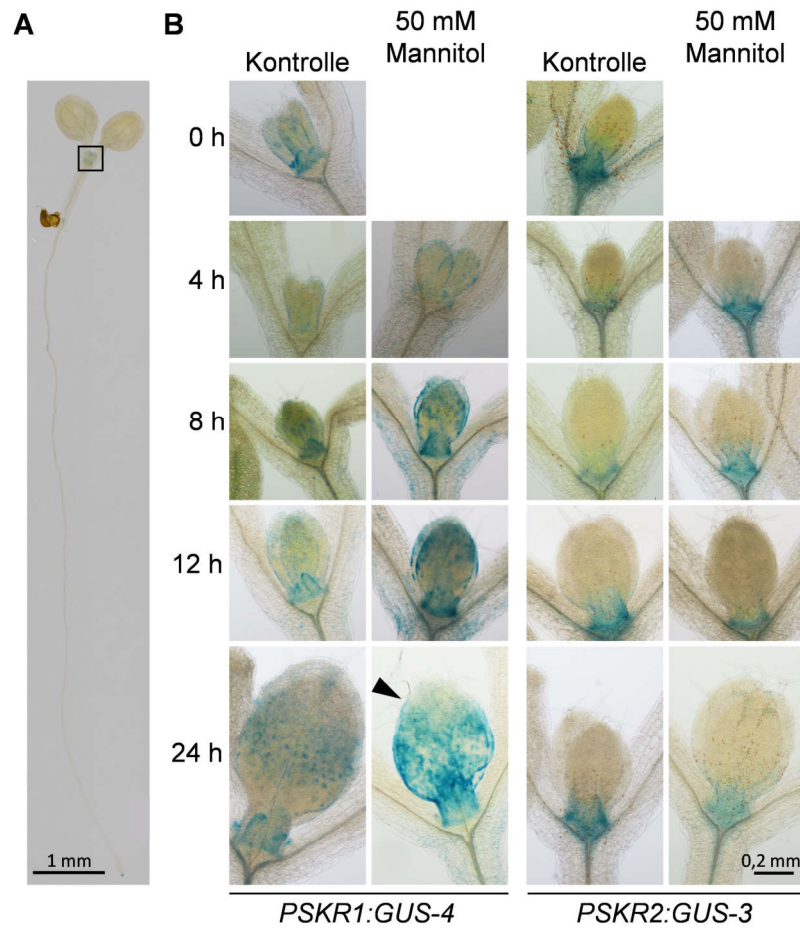


Abbildung 6: Induktion der *PSKR1-GUS*-Expression unter osmotischem Stress nach 24 Stunden.

Fünf Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war, und die Expression von *PSKR1* und *PSKR2* über GUS-Färbung zu unterschiedlichen Zeitpunkten bis zu 24 Stunden nach dem Transfer untersucht.

A Übersicht über einen fünf Tage alten Keimling. Durch den eingefügten Kasten ist der Bereich markiert, der in B vergrößert dargestellt wird.

B Promotoraktivität von *PSKR1* und *PSKR2* im Bereich des Sprossapikalmeristems und der ersten echten Blätter nach Behandlung mit Mannitol, zu unterschiedlichen Zeiten.

Für weitere Expressionsanalysen wurden sieben Tage alte Keimlinge verwendet, da die ersten echten Blätter nach fünf Tagen Anzucht sehr klein sind. Auch in diesem Entwicklungsstadium war eine Induktion der *PSKR1*-Promotoraktivität im Bereich der ersten echten Blätter erkennbar (Abbildung 7 A, D), nicht jedoch in anderen Geweben (Abbildung 7 B, C, E, F). Für *PSKR2* konnten keine Unterschiede im Expressionsmuster junger Keimlinge beobachtet werden (Abbildung 7 G - L). Dies bestätigt die Ergebnisse der Wachstumsanalysen, in denen *PSKR1* und nicht *PSKR2* das Wachstum bei osmotischem Stress unterstützt.

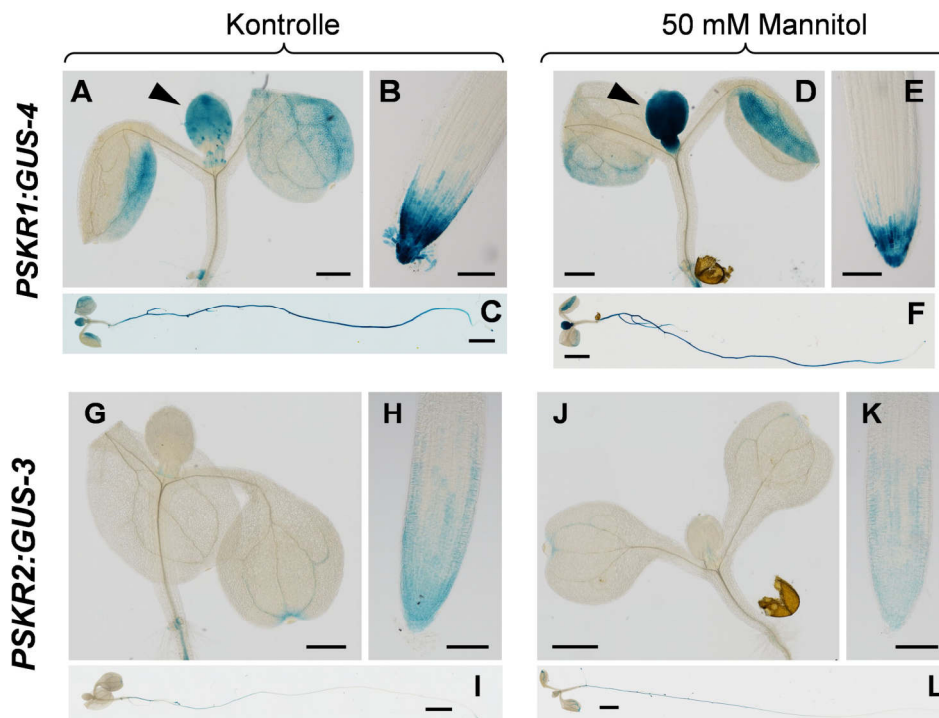


Abbildung 7: *PSKR1*-Expression wird in jungen Sprossgeweben durch osmotischen Stress induziert.

Sieben Tage alte Keimlinge der Linien *PSKR1:GUS-4* (A – F) und *PSKR2:GUS-3* (G – L) wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war, und für weitere 24 h angezogen.

A – F Zeigen die Promotoraktivität von *PSKR1* in A: Spross bei Kontrollbedingungen, D: Spross bei Mannitolbehandlung, B: Wurzelspitze bei Kontrollbedingungen, E: Wurzelspitze bei Mannitolbehandlung, C: Keimling bei Kontrollbedingungen, F: Keimling bei Mannitolbehandlung. A und B zeigen einen vergrößerten Ausschnitt von C, D und E von F. Pfeilspitzen zeigen auf erste echte Blätter, in denen eine verstärkte Färbung/Promotoraktivität bei Mannitolbehandlung zu erkennen ist.

G – L Zeigen die Promotoraktivität von *PSKR2* in G: Spross bei Kontrollbedingungen, J: Spross bei Mannitolbehandlung, H: Wurzelspitze bei Kontrollbedingungen, K: Wurzelspitze bei Mannitolbehandlung, I: Keimling bei Kontrollbedingungen, L: Keimling bei Mannitolbehandlung. G und H zeigen einen vergrößerten Ausschnitt von I, J und K von L.

Messbalken: 0,5 mm in A, D, G, J; 0,1 mm in B, E, H, K; 2 mm in C, F, I, L. Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten.

Um einen Eindruck zu erhalten, ob und inwiefern sich die Expression der Rezeptoren im Spross unter anhaltendem osmotischem Stress verändert, wurde die Expression der Gene nach fünf Tagen Behandlung untersucht (Abbildung 8). Hier zeigte sich, dass die Expression von *PSKR1* mit zunehmendem Alter der Blätter abnimmt und sich weiterhin auf die jüngeren, sich entwickelnden Blätter konzentriert. Bei lang anhaltendem osmotischem Stress war eine Induktion der Expression nicht mehr erkennbar. Für *PSKR2* war ebenfalls eine Abnahme der Expression zu beobachten. Unter Kontrollbedingungen beschränkte sich die Promotoraktivität auf das Leitgewebe und unterschied sich kaum in Blättern verschiedenen Alters. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *PSKR1* vor allem während der frühen Entwicklung von Sprossorganen aktiv ist und die *PSKR1*-Expression zu Beginn bei osmotischem Stress induziert wird.

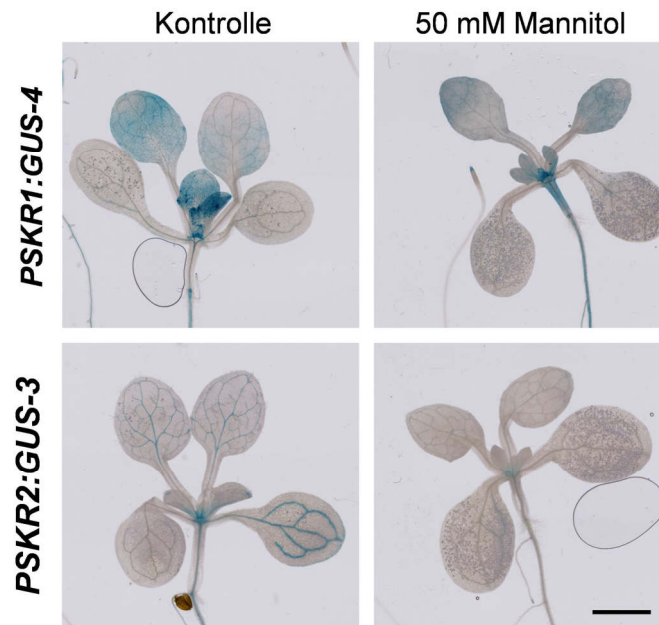


Abbildung 8: *PSKR1* ist in jungen sich entwickelnden Geweben exprimiert und weist keine Induktion der Expression bei lang anhaltendem osmotischen Stress auf.

Fünf Tage alte Keimlinge der Linien *PSKR1:GUS-4* und *PSKR2:GUS-3* wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war und für weitere fünf Tage angezogen. Messbalken: 2 mm. Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten.

Um die Ergebnisse der GUS-Reportergenuntersuchungen verifizieren zu können, wurden qRT-PCRs mit cDNA der ersten echten Blätter sieben Tage alter Keimlinge nach 24 h Behandlung durchgeführt. Für diese Analysen wurde, zusätzlich zu Mannitol, das die osmotische Stressantwort regulierende Pflanzenhormon ABA eingesetzt. Unter Kontrollbedingungen war *PSKR1* mehr als doppelt so stark exprimiert wie *PSKR2* (Abbildung 9 A). Sowohl durch Mannitol als auch durch ABA wurde die Expression von *PSKR1* auf etwa das 2,5-fache im Vergleich zur Kontrolle induziert (Abbildung 9 B). Dieses Induktionsniveau wurde durch eine höhere Konzentration von Mannitol oder ABA kaum verändert. Diese Ergebnisse bestätigten die Resultate der GUS-Studien, in denen eine erhöhte Promotoraktivität von *PSKR1* unter osmotischem Stress beobachtet worden war. Die Ergebnisse bezüglich einer Expressionsinduktion bei osmotischem Stress im Spross stimmten mit den Daten aus Genevestigator überein (Tabelle 4). Zudem wurde die *PSKR1*-Expression durch ABA induziert, was ein Hinweis auf eine Einbindung von *PSKR1* in die ABA-abhängigen osmotische Stressantwort sein könnte. Die Expression von *PSKR2* hingegen wurde nur bei starkem osmotischem Stress oder einer hohen ABA-Konzentration auf das etwa 1,25-fache erhöht (Abbildung 9 C). Dies wurde als weiterer Hinweis gedeutet, dass *PSKR2* in der osmotischen Stressantwort eine untergeordnete Rolle spielt. Aufgrund der leichten Induktion der *PSKR2*-Expression bei erhöhtem Stress wurden nachfolgende Versuche mit den jeweils höheren Konzentrationen von Mannitol und ABA durchgeführt.

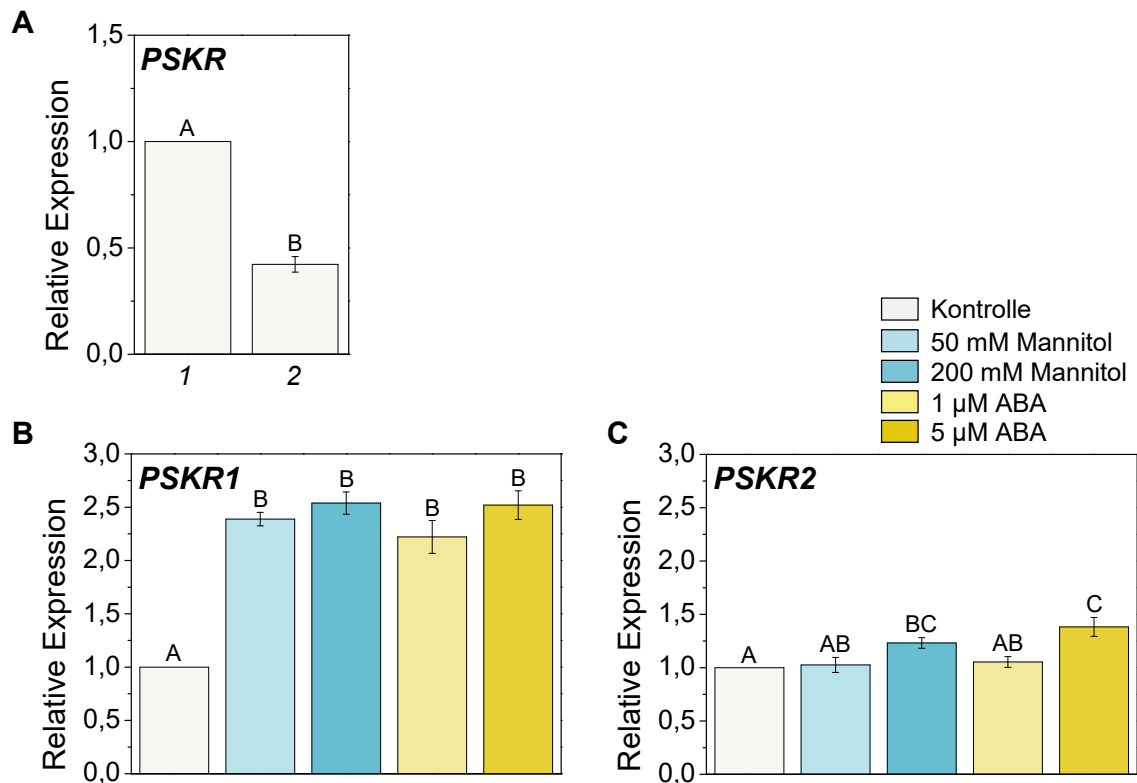


Abbildung 9: PSKR1-Expression wird in jungen sich entwickelnden Sprossgeweben durch osmotischen Stress und ABA induziert.

Sieben Tage alte Wildtypkeimlinge wurden auf Medium mit oder ohne Mannitol oder ABA transferiert und für weitere 24 h angezogen. Die Transkriptmengen von *PSKR1* (B) und *PSKR2* (C) wurden in den ersten echten Blättern untersucht. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$, 3 biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen, $n = 6$).

A Relative Genexpression von *PSKR1* und *PSKR2* (\pm SE) unter Kontrollbedingungen. Die Expression von *PSKR1* wurde als Referenz gewählt und auf einen Wert von 1 gesetzt.

B Relative Expression (\pm SE) von *PSKR1*.

C Relative Expression (\pm SE) von *PSKR2*.

3.1.3 Die PSK-Genexpression wird durch osmotischen Stress und die PSK-Rezeptoren reguliert

Für *PSKR1* konnte nachgewiesen werden, dass seine Expression durch osmotischen Stress und das Stresshormon ABA induziert wird. Zur Überprüfung, ob zusätzlich zu einer verstärkten Expression von *PSKR1* auch eine Induktion der für den Liganden PSK kodierenden Gene *PSK1* - *PSK5* bei osmotischem Stress stattfindet, wurde die Expressionsänderung dieser Gene ebenfalls durch Datenbankanalysen (Tabelle 4, Seite 40) und qRT-PCR überprüft. Die Datenbankanalysen zeigten, dass *PSK2*, *PSK4* und *PSK5* durch osmotischen Stress in ihrer Expression über 10% induziert werden. Für *PSK2* und *PSK5* war dies sowohl im Spross als auch in der Wurzel zu beobachten, für *PSK4* ausschließlich im Spross. *PSK1* und *PSK3* werden in der Wurzel unter osmotischem Stress mehr als 10% reprimiert. Zusätzlich wird *PSK4* durch ABA reprimiert. Keines der anderen untersuchten PSK-Gene zeigte eine Expressionsänderung in Antwort auf ABA.

Die Expressionsänderung der PSK-Gene bei osmotischem Stress und Mannitol wurde folgend durch qRT-PCR in den ersten echten Blättern fünf Tage alter Keimlinge untersucht. Zusätzlich zu den Untersuchungen im Wildtypintergrund wurde *pskr1-3 pskr2-1* in die Analysen einbezogen. Hierdurch wurde untersucht, ob sich eine Anwesenheit der PSK-Rezeptoren auf die Expression der PSK-Gene auswirkt. Um die relative Expression der PSK-Gene unter Kontrollbedingungen vergleichen zu können, wurde das Transkriptlevel von *PSK3* auf einen Wert von 1 gesetzt und das Transkriptniveau der anderen Gene in Relation dazu berechnet. *PSK4* wurde im gewählten Gewebe am stärksten exprimiert (Abbildung 10 A). *PSK2*, *PSK3* und *PSK5* zeigten verminderte Transkriptmengen und eine *PSK1*-Expression war kaum nachweisbar. Diese Beobachtungen deckten sich überwiegend mit denen von Matsubayashi *et al.* (2006), die ebenfalls die stärkste Expression für *PSK4* detektierten und ein *PSK1*-Transkript in Blättern nicht nachweisen konnten.

Die PSK-Gene waren bei osmotischem Stress und in Antwort auf ABA differentiell reguliert. Es fand jedoch grundsätzlich keine Repression der Expression statt (Abbildung 10). Diese Daten stimmten nur wenig mit den Datenbankergebnissen überein, in denen eine Repression von *PSK1* und *PSK3* bei osmotischem Stress gezeigt wurde und für *PSK4* in Antwort auf ABA (Tabelle 4, Seite 40). Im Wildtyp wurde *PSK3* durch osmotischen Stress induziert (Abbildung 10 D), in Antwort auf ABA konnte dies bei *PSK2*, *PSK3* und *PSK4* gezeigt werden (Abbildung 10 C, D, F). Unter Kontrollbedingungen konnte in *pskr1-3 pskr2-1* für *PSK2* und *PSK4* eine induzierte Expression festgestellt werden (Abbildung 10 C, E). In der Mutante war die Expression von *PSK1*, *PSK3* und *PSK5* durch osmotischen Stress induziert und im Vergleich zum Wildtyp verstärkt (Abbildung 10 B, D, F). Als Reaktion auf ABA konnte in der Rezeptormutante für *PSK1*, *PSK4* und *PSK5* ein ähnliches Expressionsmuster wie im Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 10 B, E, F). *PSK2* und *PSK3* wurden im Gegensatz zum Wildtyp in Antwort auf ABA in der PSK-Rezeptordoppelmutante nicht induziert (Abbildung 10 C, D). Da die PSK-Gene bei osmotischem Stress und durch ABA teilweise differentiell exprimiert waren, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass der PSK-Signalweg sowohl in einer ABA-abhängigen als auch ABA-unabhängigen Antwort auf osmotischen Stress wirkt. Dies ist für *PSK4* und *PSK5* hervorzuheben. *PSK4* war am stärksten exprimiert und wies eine rezeptorunabhängige Induktion der Expression in Antwort auf ABA, jedoch nicht bei osmotischem Stress auf (Abbildung 10 E). *PSK5* war am zweitstärksten exprimiert und wies eine starke Induktion der Expression ausschließlich durch ABA auf (Abbildung 10 F). Für *PSK2* und *PSK3* wurde die durch ABA induzierte Expression durch die PSK-Rezeptoren unterstützt (Abbildung 10 C, D). Für *PSK1*, *PSK3* und *PSK5* wurde die Expression bei osmotischem Stress durch die PSK-Rezeptoren unterdrückt (Abbildung 10 B, D, F).

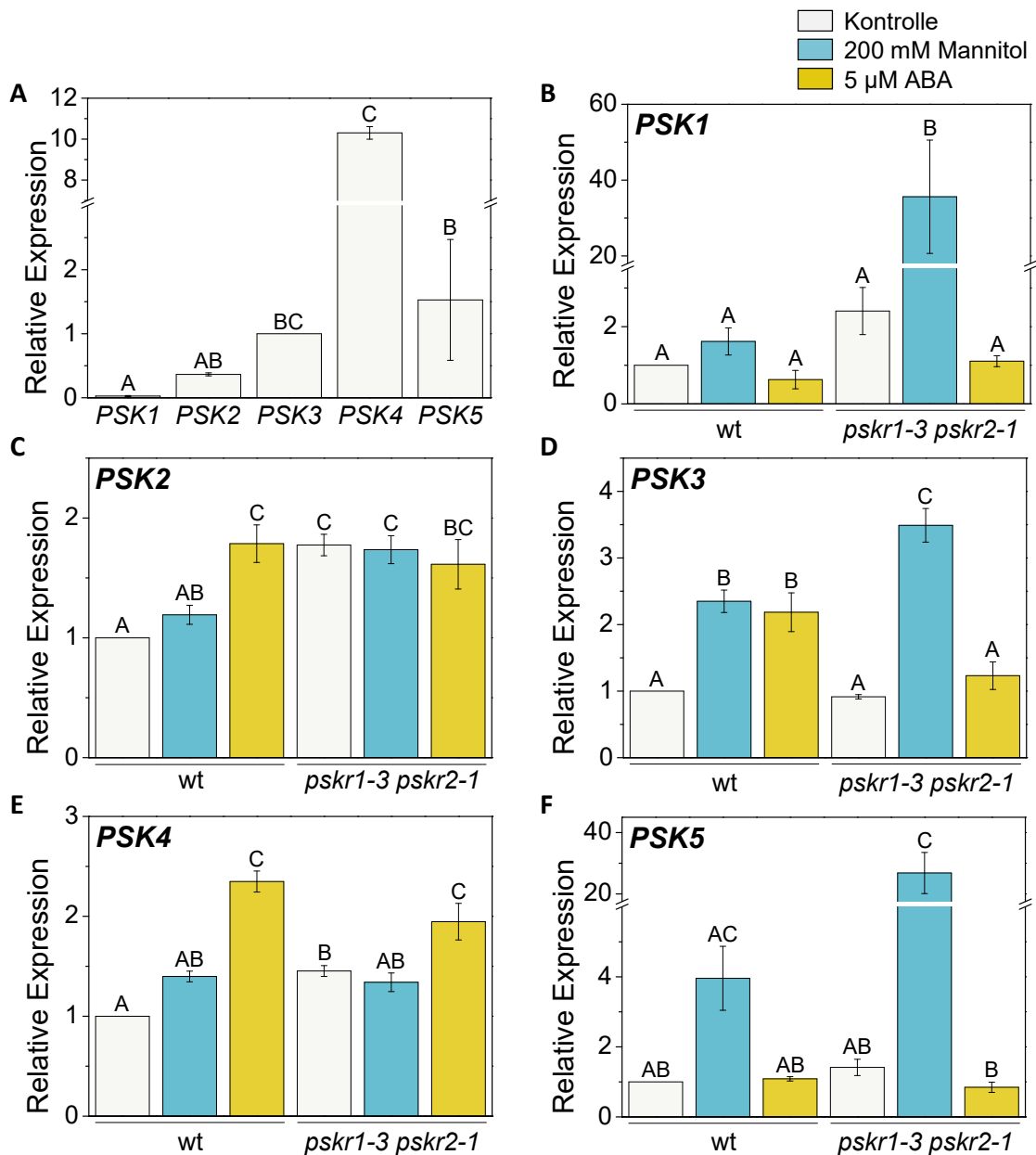


Abbildung 10: PSK-Genexpression wird unter osmotischem Stress und bei Abwesenheit der PSK-Rezeptoren differenziell reguliert.

Sieben Tage alte Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Keimlinge wurden auf Medium mit oder ohne Mannitol oder ABA transferiert und für weitere 24 h angezogen. Die Transkriptmengen von *PSK1* (B), *PSK2* (C), *PSK3* (D), *PSK4* (E) und *PSK5* (F) wurden in den ersten echten Blättern untersucht. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an. 3 biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen, n = 6.

A Relative Genexpression der *PSK*-Gene (\pm SE) im Wildtyp unter Kontrollbedingungen. Die Expression von *PSK3* wurde als Referenz gewählt und auf einen Wert von 1 gesetzt (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$).

B – F Relative Expression (\pm SE) von *PSK1*, *PSK2*, *PSK3*, *PSK4* und *PSK5* (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$ [C, D, E], Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ [B, F]).

3.1.4 Die ABA-abhängige und -unabhängige Stressantwort als mögliche Ursache für eine PSK-vermittelte osmotische Stressresistenz

Da die vorherigen Analysen Hinweise darauf gaben, dass in *pskr1-3 pskr2-1* entweder die ABA-Perzeption gestört oder eine geringere Menge des Hormons vorhanden ist und dass die ABA-unabhängige osmotische Stressantwort durch den PSK-Signalweg reguliert sein könnte, wurden diese Aspekte näher betrachtet. Um Gene identifizieren zu können, deren Aktivität durch PSK reguliert wird, war ein Microarray zur Detektion von Expressionsveränderungen durchgeführt worden (Daten zur Verfügung gestellt von M. Sauter, unveröffentlicht). Als pflanzliches Material für diesen Versuch hatten, statt des Sprosses, die Wurzeln fünf Tage alter Keimlinge gedient. Für dieses Wachstumsstadium und Organ ist eine wachstumsfördernde Wirkung von PSK beschrieben (Kutschmar *et al.*, 2009). Relative Genexpressionsunterschiede des Wildtyps im Vergleich zu der *tpst-1*-Mutante, in der die Sulfatierung von Peptiden unterbunden ist (Komori *et al.*, 2009), wurden unter Kontrollbedingungen bestimmt. Zusätzlich wurden die Expressionsunterschiede, die bei einer Behandlung der Mutante mit PSK im Vergleich zum Wildtyp und zur unbehandelten Mutante auftraten, untersucht. Genexpressionen wurden als induziert gewertet, wenn sie in Relation zur Vergleichslinie/-behandlung größer gleich das Zweifache waren und als herunterreguliert, wenn sie Werte kleiner gleich 0,5 aufwiesen. So konnten zum einen Regulationen von Genexpressionen identifiziert werden, die durch sulfatierte Peptide hervorgerufen werden. Zum anderen konnte zusätzlich analysiert werden, ob diese Regulationen durch PSK allein, durch andere sulfatierte Peptide oder durch beides verursacht werden. In dieser Microarrayanalyse konnten die Gene *DREB2A* und *PYL6* (*PYRABACTIN RESISTANCE 1-LIKE 6/REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR 9, RCAR9*) als reguliert identifiziert werden.

3.1.4.1 *DREB2A*-Expression wird in *pskr1-3 pskr2-1* bei osmotischem Stress induziert

Zunächst wurde die Expression des Gens *DREB2A* (At5g05410) in den ersten echten Blättern untersucht. *DREB2A* ist ein zentraler Regulator der ABA-unabhängigen Stressantwort, interagiert aber auch mit der ABA-abhängigen Genexpression (Yoshida *et al.*, 2014). Die Daten des Microarrays besagten, dass die Expression des Gen durch sulfatierte Peptide, jedoch nicht durch PSK, induziert wird (Anhang Tabelle 17, Seite 182). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von *DREB2A* in *pskr1-3 pskr2-1* bei osmotischem Stress in den ersten echten Blättern induziert wird (Abbildung 11), während im Wildtyp keine statistisch signifikante Induktion zu beobachten war. Dies deutete darauf hin, dass in der Mutante bei osmotischem Stress eine Aktivierung von Stressantwortgenen über den ABA-unabhängigen Signalweg stattfindet. Was wiederum bedeuten könnte, dass der PSK-Signalweg die Induktion der ABA-unabhängigen Stressantwort unterdrückt. Eine Unterdrückung der ABA-unabhängigen Stressantwort erklärt jedoch nicht die verstärkte

Resistenz gegen osmotischen Stress im Wildtyp. Vielmehr könnte dies bedeuten, dass der ABA-Signalweg in der Mutante gestört ist und der ABA-unabhängige Stresssignalweg deshalb induziert wird.

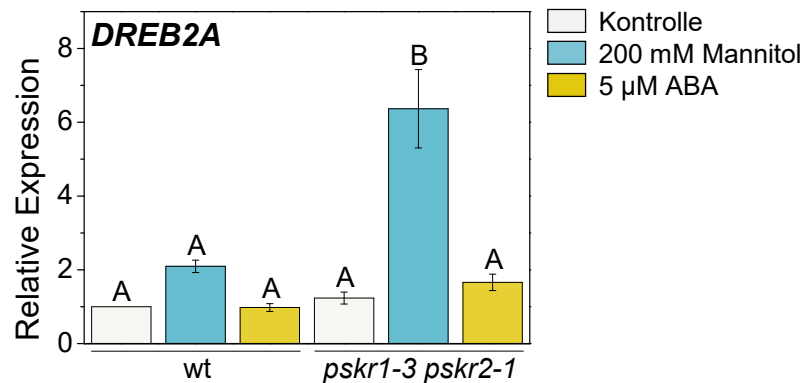


Abbildung 11: DREB2A wird in *pskr1-3 pskr2-1* bei osmotischem Stress verstärkt exprimiert.

Sieben Tage alte Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Keimlinge wurden auf Medium mit oder ohne Mannitol oder ABA transferiert und für weitere 24 h angezogen. Die relative Expression (\pm SE) von *DREB2A* wurde in den ersten echten Blättern untersucht. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, 3 biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen, $n = 6$).

3.1.4.2 PYL6-Expression ist in *pskr1-3 pskr2-1* induziert

In dem bereits angeführten Microarray war ein Gen, das für ein ABA-bindendes rezeptorähnliches Protein kodiert, *PYL6* (At2g40330), aus der Familie der PYR/PYL/RCAR-Proteine, durch PSK reprimiert (Anhang Tabelle 17, Seite 182). *PYL6* reguliert im ABA-Signalweg den Stomaschluss und die dadurch vermittelte Trockenresistenz und weniger die Keimung und die ABA-vermittelte Wurzelwachstumsinhibierung (Takeuchi *et al.*, 2015). Die Expression des Gens wurde in *pskr1-3 pskr2-1* in den ersten echten Blättern im Vergleich zum Wildtyp unter osmotischen Stressbedingungen analysiert.

Hier konnte nachgewiesen werden, dass *PYL6* in *pskr1-3 pskr2-1* unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert ist als im Wildtyp und die Expression bei osmotischem Stress induziert wird, was im Wildtyp nicht der Fall war (Abbildung 12). Da zunächst angenommen worden war, dass der PSK-Signalweg entweder eine Induktion der ABA-Wahrnehmung herbeiführen könnte oder dass in der Mutante ein geringerer ABA-Gehalt vorhanden ist, gab dieses Ergebnis einen Hinweis darauf, dass in der Mutante weniger ABA vorhanden sein könnte. Dies könnte zu einer Induktion der Expression des ABA-Rezeptors *PYL6* in der Mutante führen, insbesondere unter osmotischen Stressbedingungen, in denen eine verstärkte ABA-Produktion vorherrschen sollte.

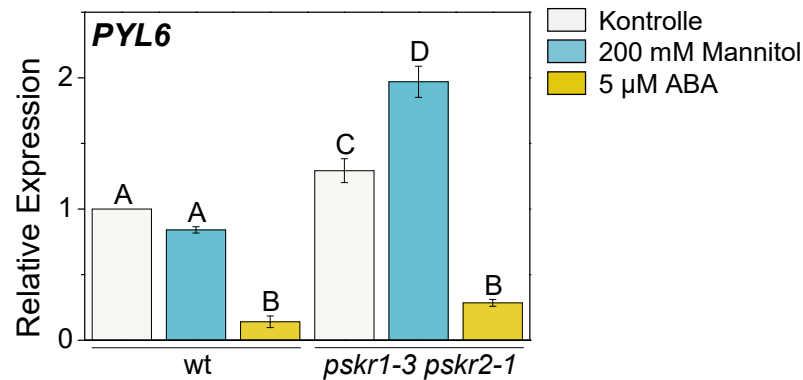


Abbildung 12: PYL6 wird in pskr1-3 pskr2-1 bei osmotischem Stress verstärkt exprimiert.

Sieben Tage alte Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Keimlinge wurden auf Medium mit oder ohne Mannitol oder ABA transferiert und für weitere 24 h angezogen. Die relative Expression (\pm SE) von PYL6 wurde in den ersten echten Blättern untersucht. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$, 3 biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen, $n = 6$).

3.1.4.3 Ausschalten von ABA-Metabolismus- und -Signalleitungsgenen hat keinen Einfluss auf PSK-abhängiges Wachstum

Da die bisherigen Ergebnisse darauf hinwiesen, dass der PSK-Signalweg möglicherweise mit dem ABA-Metabolismus interagiert, wurden Untersuchungen an *knockout*-Linien durchgeführt. Bei den ausgeschalteten Genen handelte sich um Schlüsselgene des ABA-Metabolismus und der -perzeption, sowie der ABA-abhängigen und -unabhängigen Stressantwort (Abbildung 13, hellrot). Einige dieser Gene sind PSK-reguliert. Die Expression der 9-*cis*-Epoxy-carotinoiddioxygenase *NCED9* (*NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 9*, At1g78390) wird durch PSK reguliert (persönliche Mitteilung M. Sauter). Auch aus der Gruppe der 8'-Hydroxylasen sind zwei Mitglieder, *CYP707A1* und *CYP707A2* (At4g19230, At2g29090), PSK-reguliert (persönliche Mitteilung M. Sauter). Bei der Perzeption und Weiterleitung des ABA-Signals sind PYL6 (Abbildung 12, Anhang Tabelle 17, Seite 182) und *SNRK2.9* (*SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2.9*; At2g23030) durch PSK in ihrer Expression reguliert (persönliche Mitteilung M. Sauter). *DREB2A* ist ein Schlüsselregulator der ABA-unabhängigen osmotischen Stressantwort und ist indirekt PSK-reguliert (Abbildung 11).

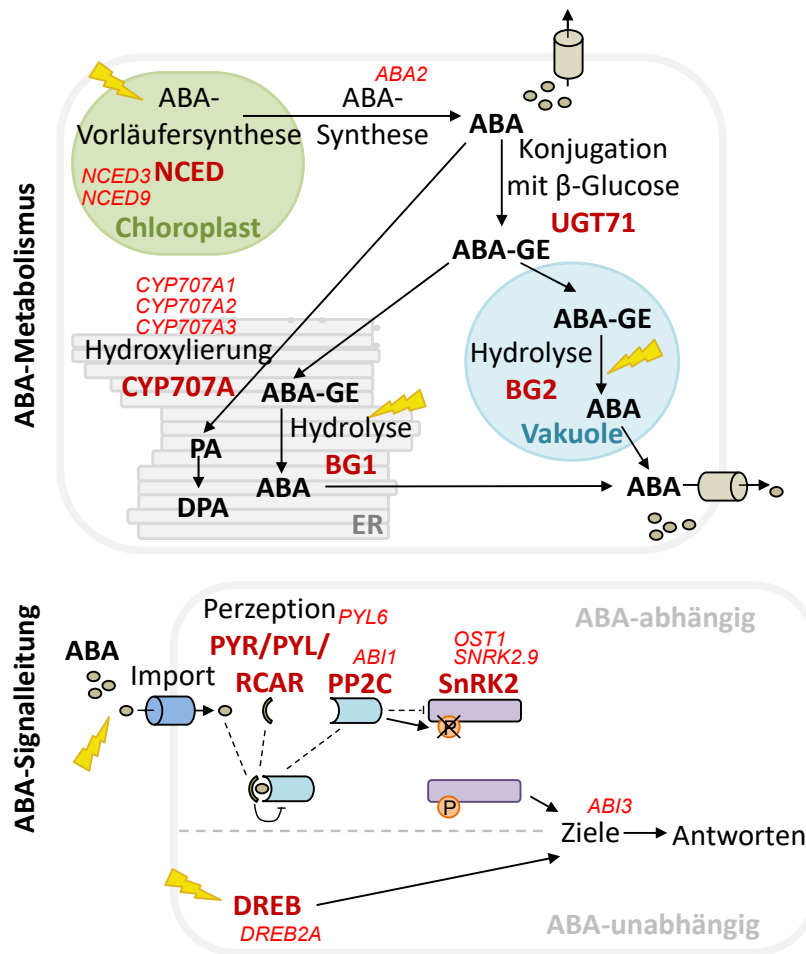


Abbildung 13: Schlüsselgene des ABA-Metabolismus und der -Signalleitung bei osmotischem Stress.

In dieser Arbeit wurden Gene untersucht (hellrot), die den ABA-Metabolismus und -Signalweg sowie die osmotische Stressantwort beeinflussen. Es wurden die Linien *nced3*, *nced9-1*, *aba2-1*, *cyp707a1-1*, *cyp707a1-1 cyp707a3-1*, *cyp707a2-1 cyp707a3-1*, *pyl6*, *abi1-2*, *ost1-4*, *snRK2.9-1*, *abi3* und *dreb2a 1* untersucht. Erklärungen der Abkürzungen sind der Einleitung zu entnehmen.

In den Einfach- und Doppelmutanten wurde zunächst die Inhibierung der Expression der betroffenen Gene bestätigt (Daten nicht gezeigt) und das Primärwurzelwachstum der Linien in Antwort auf PSK untersucht (Abbildung 14 A). Zum anderen wurde das Sprosswachstum unter osmotischen Stressbedingungen, hervorgerufen durch Mannitol, quantifiziert (Abbildung 14 B).

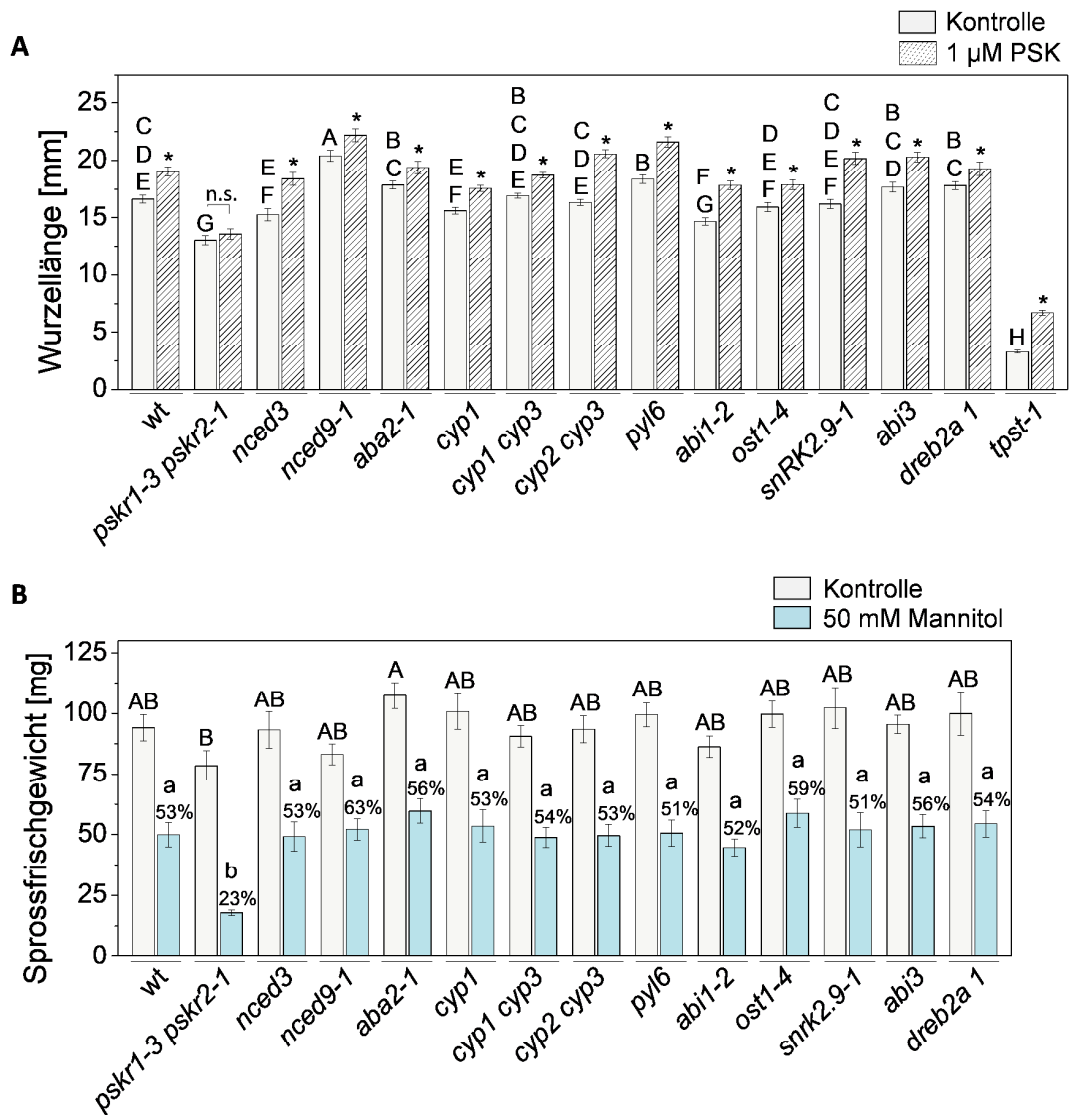


Abbildung 14: Mutanten von ABA-Metabolismus- und -Signalweggenen zeigen keine Veränderungen des Spross- und Wurzelwachstums in Antwort auf PSK und osmotischen Stress.

A Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen auf Medium versetzt mit oder ohne PSK. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zum jeweiligen Genotyp unter Kontrollbedingungen an (Students t -Test, $p \leq 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 62$).

B Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war, und nach weiteren 21 Tagen Anzucht das Sprossfrischgewicht (\pm SE) analysiert. Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Sprossfrischgewichts unter Kontrollbedingungen. Bei der Mannitolbehandlung erzielte Daten wurden als prozentualer Anteil des Sprossfrischgewichts der jeweiligen Linie unter Kontrollbedingungen berechnet und die statistischen Unterschiede mit Kleinbuchstaben dargestellt (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$, 2 unabhängige Experimente, $n \geq 12$).

Hinsichtlich der Wurzellänge konnten für drei Mutanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 14 A). Bei Ausschalten des Gens *ABI1* war eine Reduktion der Wurzellänge vergleichbar zu *pskr1-3 pskr2-1* zu beobachten. Bei einem Verlust der Genprodukte von *NCED9* und *PYL6* war ein verstärktes Wachstum der Primärwurzel im Vergleich zum Wildtyp zu verzeichnen. Alle Linien zeigten einen Längenzuwachs der Primärwurzel in Antwort auf PSK. Der Wildtyp wies bei osmotischem Stress eine Reduktion des Sprossgewichtes um 47% auf. Alle untersuchten Mutanten

zeigten ähnliche Werte an und unterschieden sich hinsichtlich dessen nicht signifikant vom Wildtyp (Abbildung 14 B). In diesen Versuchen konnte kein Faktor identifiziert werden, der eine Schlüsselrolle im PSK-Signalweg innerhalb der untersuchten Prozesse zu übernimmt.

3.1.5 Der PSK-Signalweg reguliert den ABA-Metabolismus

Da es Hinweise darauf gab, dass der PSK- mit dem ABA-Signalweg auf Ebene des ABA-Metabolismus interagieren könnte, wurde von K. Rajamanickam (AG Sauter) in Zusammenarbeit mit B. Hause (Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle an der Saale, Deutschland) die ABA-Konzentration in Wildtyp und *pskr1-3 pskr2-1* bestimmt (in Begutachtung, Schönhof *et al.*). Die Analysen ergaben, dass *pskr1-3 pskr2-1* unter Kontrollbedingungen im Spross eine ABA-Konzentration von etwa 2,5 pmol/g, vergleichbar mit dem Wildtyp, aufweist. Diese nahm jedoch bei osmotischem Stress nicht wie im Wildtyp zu, sondern blieb gleich (Abbildung 15 A; Daten erhoben von K. Rajamanickam und B. Hause, Publikation in Begutachtung, Schönhof *et al.*). In der Wurzel wies *pskr1-3 pskr2-1* bereits unter Kontrollbedingungen einen im Vergleich zum Wildtyp reduzierten ABA-Gehalt auf (Abbildung 15 B; Daten erhoben von K. Rajamanickam und B. Hause, Publikation in Begutachtung, Schönhof *et al.*). Bei zunehmendem osmotischem Stress nahm die ABA-Konzentration in der Wurzel des Wildtyps von 6 pmol/g auf 12 pmol/g bei 200 mM Mannitol zu. In *pskr1-3 pskr2-1* war ebenfalls eine Verdopplung des Gehalts von 4 pmol/g bei Kontrollbedingungen auf 8 pmol/g bei 200 mM Mannitol zu beobachten.

Die gleichbleibende ABA-Konzentration im Spross von *pskr1-3 pskr2-1* bei zunehmendem osmotischem Stress legte die Annahme nahe, dass der PSK-Signalweg die Synthese und/oder Freisetzung von ABA begünstigen könnte. Deshalb wurde, zusätzlich zur Analyse von *knockout*-Linien (Abbildung 14), eine detaillierte Untersuchung der Expression von ABA-Metabolismogenen durchgeführt.

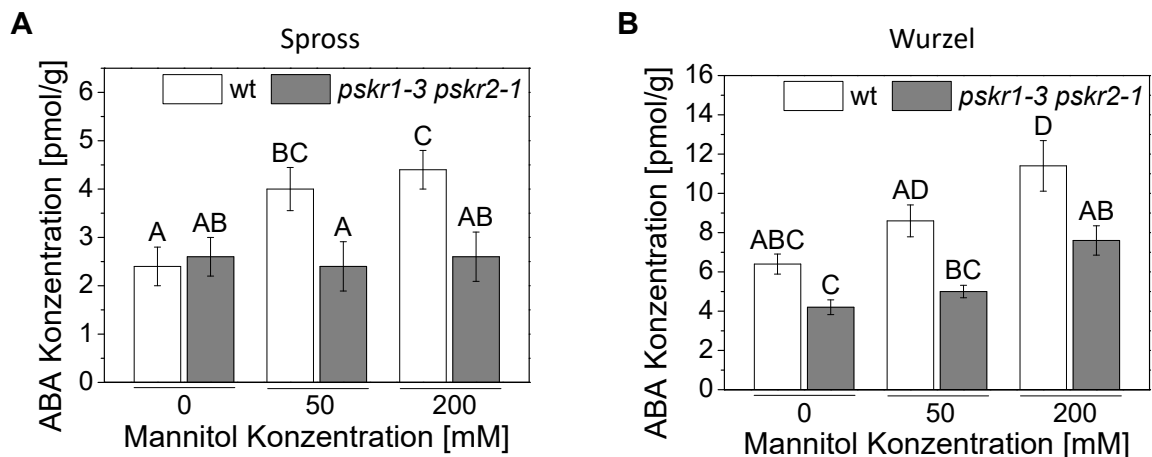


Abbildung 15: PSK-Signalweg trägt zur Erhöhung des ABA-Gehalts unter osmotischem Stress bei.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit verschiedenen Konzentrationen von Mannitol versetzt worden war und nach weiteren sieben Tagen Anzucht für eine Messung des ABA-Gehalts eingesetzt. Spross (A) und Wurzel (B) wurden getrennt analysiert und die ABA-Konzentration pro g Frischgewicht (\pm SE) bestimmt. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, $n = 5$, 5 biologische Replikate). Daten erhoben von K. Rajamanickam (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) und B. Hause (Leibnizinstitut für Pflanzenbiochemie (Publikation in Begutachtung, Schönhof *et al.*).

3.1.5.1 Der PSK-Signalweg beeinflusst nicht die Expression von 9-cis-Epoxycarotinoiddioxygenasen

Als Schlüsselenzyme für die ABA-Synthese gelten die Mitglieder der 9-cis-Epoxycarotinoiddioxygenasenfamilie (Schwartz *et al.*, 2003; Nambara & Marion-Poll, 2005). Die Expression der für diese Enzyme kodierenden Gene wurde in Abhängigkeit vom PSK-Signalweg analysiert. Es wurden *NCED3* (At3g14440), *NCED5* (At1g30100) und *NCED9* auf ihre Expressionsänderung unter osmotischem Stress und ABA-Einwirkung in *pskr1-3 pskr2-1* im Vergleich zum Wildtyp in den ersten echten Blättern untersucht (Abbildung 16). *NCED3*, unterstützt durch *NCED5*, ist hauptverantwortlich für die Katalyse von 9-cis-Xanthophyllen zu Xanthoxin (Iuchi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003). Die Expression von *NCED9* wird durch PSK reguliert (persönliche Mitteilung M. Sauter).

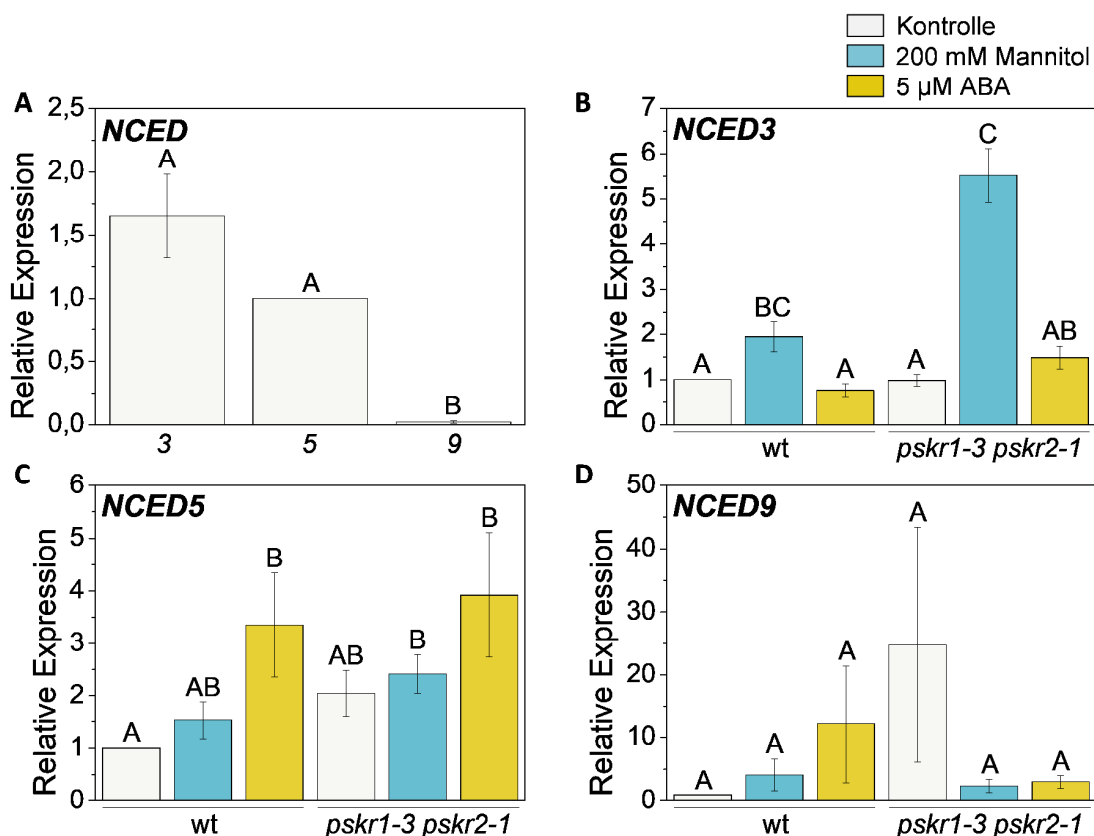


Abbildung 16: Die Expression von NCED-Genen ist unabhängig vom PSK-Signalweg.

Sieben Tage alte Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Keimlinge wurden auf Medium mit oder ohne Mannitol oder ABA transferiert und für weitere 24 h angezogen. Die Transkriptmengen von *NCED3* (B), *NCED5* (C) und *NCED9* (D) wurden in den ersten echten Blättern untersucht. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, 3 biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen, $n = 6$).

A Relative Genexpression (\pm SE) im Wildtyp unter Kontrollbedingungen. Die Expression von *NCED5* wurde als Referenz gewählt und auf einen Wert von 1 gesetzt.

B – D Relative Expression (\pm SE) von *NCED3*, *NCED5* und *NCED9*.

Unter Kontrollbedingungen war *NCED3* im Wildtyp etwa 1,6 mal so stark exprimiert wie *NCED5*, was sich mit den Aussagen von Frey *et al.* (2012) zur Expressionsstärke in Rosettenblättern deckt (Abbildung 16 A). Für *NCED9* war eine Expression im Spross kaum nachweisbar. Die Expression von *NCED3* wurde im Wildtyp durch osmotischen Stress auf das zweifache induziert, jedoch nicht durch Zugabe von ABA (Abbildung 16 B). Bei *pskr1-3 pskr2-1* wurde die Expression auf das 5,5-fache induziert. Dieser Wert unterschied sich jedoch nicht statistisch signifikant zu der Expressionsinduktion im Wildtyp. Von *NCED5* wurde die Expression im Wildtyp durch ABA auf etwa das Dreifache erhöht (Abbildung 16 C). Das gleiche Expressionsmuster war für die Mutante zu sehen. *NCED9* zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen (Abbildung 16 D). Auch in den vorigen Untersuchungen an den *knockout*-Linien *nced3* und *nced9-1* war keine starke Veränderung des Phänotyps in Bezug auf das Wachstum zu beobachten gewesen (Abbildung 14). Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass der PSK-Signalweg nicht die ABA-Synthese reguliert.

3.1.5.2 Der PSK-Signalweg beeinflusst nicht die Expression von ABA 8'-Hydroxylasegenen bei osmotischem Stress

Eine irreversible Inaktivierung und ein dadurch induzierter Abbau von ABA geschieht durch Oxidation durch 8'-Hydroxylasen der CYP707A-Familie. Es wurde die Expression aller Gene der Familie, *CYP707A1* - *CYP707A4*, in den ersten echten Blättern untersucht. *CYP707A2* und *CYP707A3* (At5g45340) waren unter Kontrollbedingungen im Wildtyp gleich stark exprimiert, *CYP707A1* und *CYP707A4* (At3g19270) im Vergleich dazu weniger als ein Achtel so stark (Abbildung 17 A). Eine ähnliche Tendenz wurde bereits für die Expression der Gene in Rosettenblättern gezeigt (Saito *et al.*, 2004). Die Expression von *CYP707A3* war dort vergleichsweise stark, gefolgt von *CYP707A2* und einer sehr schwachen Expression von *CYP707A1* und *CYP707A4*.

Die Expression von *CYP707A1* und *CYP707A2* wurde im Wildtyp nur durch ABA und nicht durch osmotischen Stress induziert (Abbildung 17 B, C). *CYP707A1* war unter Kontrollbedingungen in *pskr1-3 pskr2-1* 2,5-mal so stark wie im Wildtyp exprimiert. Die Expression wurde ausschließlich durch ABA induziert. Die Expression von *CYP707A2* war in der Mutante unter Kontrollbedingungen auf das 0,8-fache reduziert. Auch hier war eine Induktion der Expression in Antwort auf ABA zu verzeichnen. Die Expression von *CYP707A3* veränderte sich unter Einfluss von ABA und osmotischem Stress nicht, zudem war auch kein Unterschied in der Expression der Mutante zu erkennen (Abbildung 17 D). Auch für *CYP707A4* waren keine statistisch signifikanten Veränderungen der Expression im Wildtyp in Antwort auf osmotischen Stress und ABA erkennbar (Abbildung 17 E). In *pskr1-3 pskr2-1* war die Expression unter Kontrollbedingungen auf die Hälfte des Wildtyps reduziert und die Expression in Antwort auf ABA auf etwa das Dreifache der Expression in der Mutante unter Kontrollbedingungen induziert.

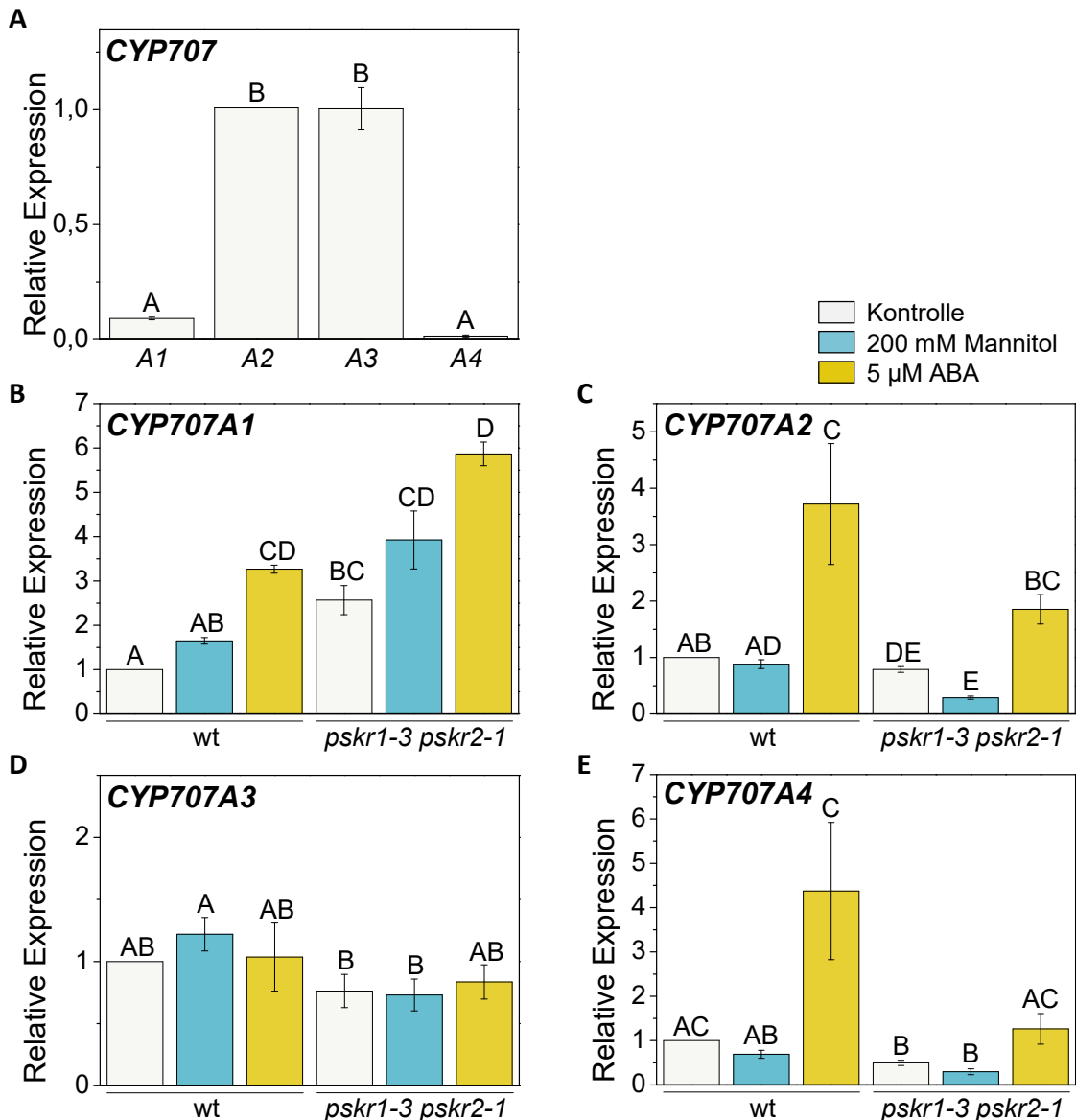


Abbildung 17: Die Expression der ABA 8'-Hydroxylasegene wird kaum durch den PSK-Signalweg reguliert.

Sieben Tage alte Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Keimlinge wurden auf Medium mit oder ohne Mannitol oder ABA transferiert und für weitere 24 h angezogen. Die Transkriptmengen von *CYP707A1* (B), *CYP707A2* (C), *CYP707A3* (D) und *CYP707A4* (E) wurden in den ersten echten Blättern untersucht. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, 3 biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen, $n = 6$).

A Relative Genexpression (\pm SE) im Wildtyp unter Kontrollbedingungen. Die Expression von *CYP707A2* wurde als Referenz gewählt und auf einen Wert von 1 gesetzt.

B – E Relative Expression (\pm SE) von *CYP707A1*, *CYP707A2*, *CYP707A3* und *CYP707A4*.

Auch diese Ergebnisse konnten eine Reduktion der ABA-Konzentration in der Mutante nicht erklären. Zwar ist *CYP707A1* verstärkt in der Mutante exprimiert, aber dies bereits unter Kontrollbedingungen, bei der kein Unterschied im ABA-Gehalt festgestellt worden war (Abbildung 17 B). Einen Ausgleich könnte die leichte Reduktion der Expression der anderen *CYP707A*-Gene in der Mutante bei Behandlung mit Mannitol geben. Die Ergebnisse aus den vorigen Untersuchungen bezüglich der Wurzellänge und der Reaktion auf osmotischen Stress zeigten für T-DNA-Insertionslinien der Gene *CYP707A1*, -2 und -3 ebenfalls keine

signifikant veränderten Phänotypen (Abbildung 14). Eine Verbindung zur PSK-vermittelten Induktion der ABA-Konzentration unter osmotischem Stress ist somit unwahrscheinlich.

3.1.5.3 Das ABA Glucosyltransferasegen *UGT71B6* wird durch den PSK-Signalweg reprimiert

Zusätzliche zu einer ABA-Hydroxylierung kann es zu einer temporären Inaktivierung des Hormons durch eine Glucosekonjugation zu einem ABA-GE kommen (Lim *et al.*, 2005). *UGT71B6*, -7 und -8 (At3g21780, At3g21790, At3g21800) agieren in der Glucosekonjugation von ABA (Dong *et al.*, 2014).

UGT71B7 war im untersuchten Gewebe am stärksten exprimiert, *UGT71B6* schwach und *UGT71B8* kaum (Abbildung 18 A). *UGT71B6* wurde nicht durch ABA, jedoch bei osmotischem Stress in *pskr1-3 pskr2-1* 25-fach, im Wildtyp 7-fach im Vergleich zum Wildtyp unter Kontrollbedingungen induziert (Abbildung 18 B). Die Expression von *UGT71B7* wurde im Wildtyp sowohl durch osmotischen Stress als auch durch ABA auf etwa das 1,5-fache der Kontrolle induziert (Abbildung 18 C). Das gleiche Muster war für die Mutante zu beobachten. *UGT71B8* zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen in Antwort auf ABA und osmotischen Stress (Abbildung 18 D). Die Expressionsveränderung von *UGT71B6* könnte ein Schlüsselprozess für die fehlende Erhöhung der ABA-Konzentration unter Stressbedingungen in der Mutante sein.

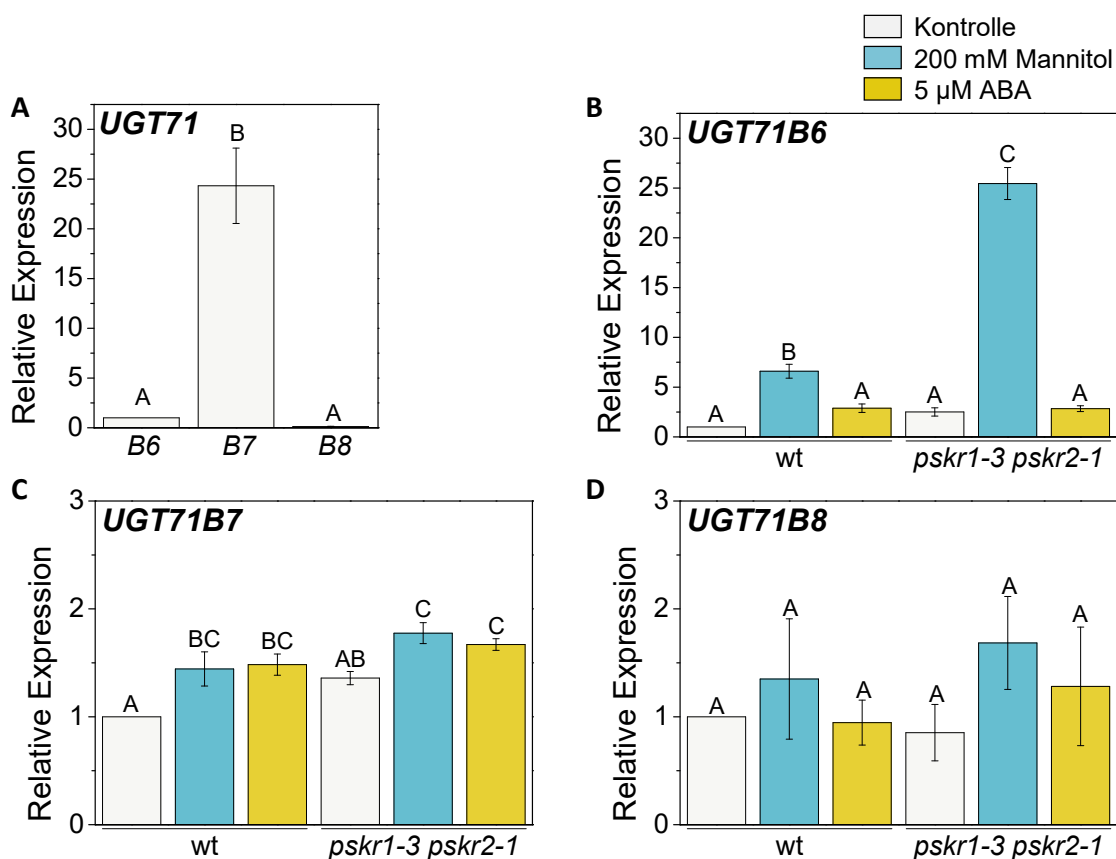


Abbildung 18: UGT71B6 wird bei osmotischem Stress durch PSK-Rezeptoren reprimiert.

Sieben Tage alte Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Keimlinge wurden auf Medium mit oder ohne Mannitol oder ABA transferiert und für weitere 24 h angezogen. Die Transkriptmengen von *UGT71B6* (B), *UGT71B7* (C) und *UGT71B8* (D) wurden in den ersten echten Blättern untersucht. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, 3 biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen, $n = 6$).

A Relative Genexpression (\pm SE) im Wildtyp unter Kontrollbedingungen. Die Expression von *UGT71B6* wurde als Referenz gewählt und auf einen Wert von 1 gesetzt.

B – D Relative Expression (\pm SE) von *UGT71B6*, *UGT71B7* und *UGT71B8*.

3.1.5.4 Die Expression des ABA β -Glucosidasegens *BG1* wird durch den PSK-Signalweg unterstützt

Die durch Glucosyltransferasen katalysierte Bindung von Glucose an ABA kann durch eine Hydrolysierung revertiert und dadurch ABA reaktiviert werden (Lee *et al.*, 2006a; Xu *et al.*, 2012). Für diesen Prozess sind zwei ABA β -Glucosidasen beschrieben, *BG1* (At1g52400) und *BG2* (At2g32860), die auf ihre Expression in den ersten echten Blättern in Antwort auf osmotischen Stress und ABA untersucht wurden.

Beide Gene zeigten, sowohl im Wildtyp als auch in *pskr1-3 pskr2-1*, eine Induktion der Expression durch ABA und nicht durch osmotischen Stress (Abbildung 19 C, D). Die Expression von *BG1*, das im Wildtyp stärker exprimiert wurde als *BG2* (Abbildung 19 A), wurde jedoch in der Mutante bei osmotischem Stress auf etwa ein Drittel im Vergleich zum Wildtyp unter Kontrollbedingungen reprimiert (Abbildung 19 B). Durch den Einfluss des PSK-Signalwegs könnte somit vermehrt ABA aktiviert werden. Dies ist eine weitere mögliche

Erklärung für einen erhöhten ABA-Gehalt bei osmotischem Stress, der in *pskr1-3 pskr2-1* nicht zu beobachten war.

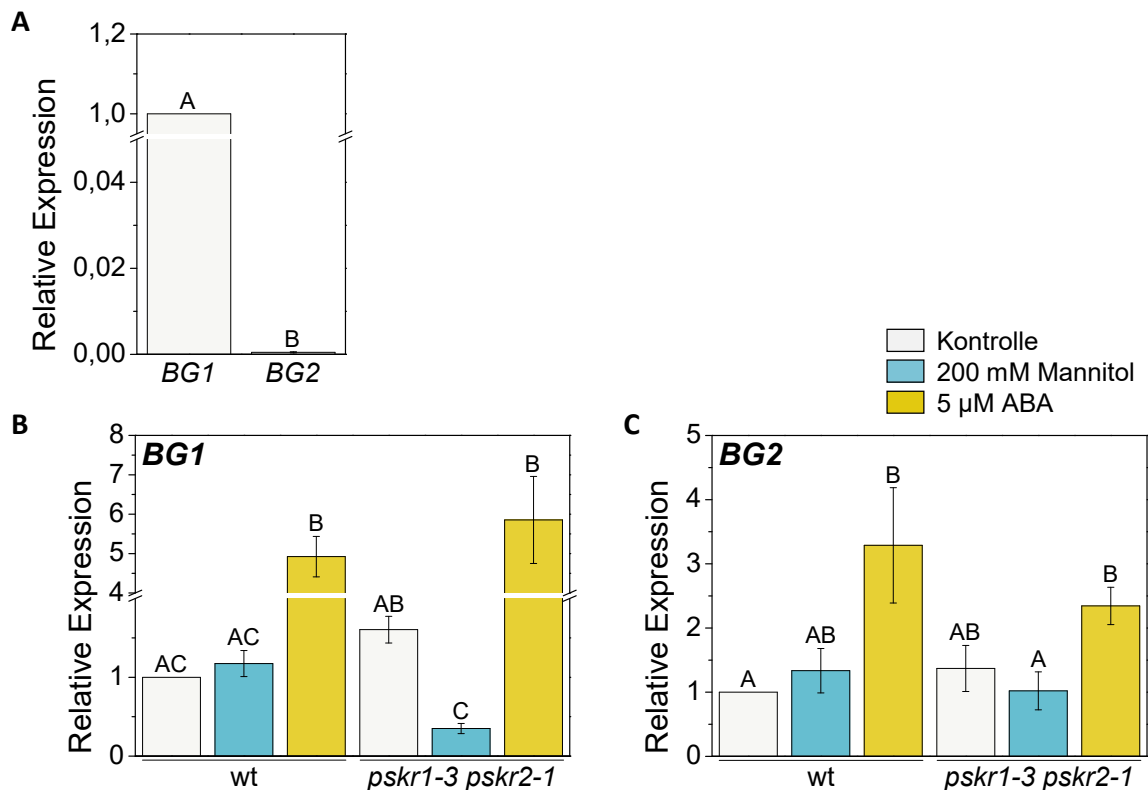


Abbildung 19: Die Expression von BG1 wird unter osmotischem Stress durch den PSK-Signalweg unterstützt.

Sieben Tage alte Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Keimlinge wurden auf Medium mit oder ohne Mannitol oder ABA transferiert und für weitere 24 h angezogen. Die Transkriptmengen von BG1 (B) und BG2 (C) wurden in den ersten echten Blättern untersucht. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, 3 biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen, $n = 6$).

A Relative Genexpression (\pm SE) im Wildtyp unter Kontrollbedingungen. Die Expression von BG1 wurde als Referenz gewählt und auf einen Wert von 1 gesetzt.

B - C Relative Expression (\pm SE) von BG1 und BG2.

3.1.6 Die PSK-Rezeptoren verstärken die durch ABA und Mannitol verursachte Inhibierung der frühen Keimlingsentwicklung

ABA vermittelt ein Signal zur Erhaltung der Dormanz bei ungünstigen Keimungs- und Wachstumsbedingungen (Shu *et al.*, 2016). Auch die Entwicklung der Pflanze direkt nach der Keimung, einschließlich des Ergrünerens der Kotyledonen, wird durch ABA verzögert (Belin *et al.*, 2009). Es wurde untersucht, ob der PSK- und der ABA-Signalweg bei der Keimung und der frühen Keimlingsentwicklung unter osmotischem Stress interagieren.

In diesen Versuchen wurden der Wildtyp, *pskr1-3 pskr2-1* und drei *PSKR1*-Überexpressionslinien, *35S:PSKR1-2*, *35S:PSKR1-12*, *35S:PSKR1-GFP-1*, analysiert. Die Überexpressionslinien wurden auf die Stärke ihrer *PSKR1*-Expression über RT-PCR untersucht. Die Linie *35S:PSKR1-12* wies die schwächste Überexpressionsrate auf, die Linien

35S:PSKR1-2 und *35S:PSKR1-GFP-1* zeigten eine starke Überexpression von *PSKR1* (Anhang Abbildung 67, Seite 187). Die Keimungsrate der Linien wurde zunächst durch Zugabe von ABA in Kombination mit oder ohne PSK untersucht. Unter Kontrollbedingungen erreichte der Wildtyp eine Keimungsrate von fast 100% zwei Tage nach Stratifizierung (Anhang Abbildung 64 A, Seite 184). Durch Zugabe von PSK konnte keine Veränderung der Keimungsrate des Wildtyps im Vergleich zu Kontrollbedingungen beobachtet werden. Durch Zugabe von 1 μ M ABA konnte eine Verzögerung der Keimung hervorgerufen werden, sodass erst nach 5-6 Tagen etwa 100% der Samen gekeimt waren. Eine Zugabe von PSK zusätzlich zu ABA änderte nichts am Keimungsverhalten des Wildtyps. Keine der untersuchten PSK-Rezeptorlinien wies einen signifikanten Unterschied in der Keimungsrate unter den verschiedenen beschriebenen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 20 A). Zur Überprüfung dieser Ergebnisse unter osmotischem Stress wurde das gleiche Experiment mit einer Zugabe von Mannitol in Kombination mit oder ohne PSK durchgeführt. Bei einer Zugabe von 350 mM Mannitol verzögerte sich der Zeitpunkt der höchsten Keimungsrate nicht, jedoch konnte einen Tag nach Stratifizierung eine leichte Reduktion der Keimungsrate beobachtet werden (Anhang Abbildung 64 B, Seite 184). Auch in diesem Versuch hatte eine Zugabe von PSK keinen Einfluss auf die Keimungsrate des Wildtyps unter Kontroll- und Stressbedingungen. Gleiches galt für die untersuchten PSK-Rezeptorlinien (Abbildung 20 B). Dies lässt darauf schließen, dass der PSK-Signalweg keinen Einfluss auf die Keimung hat.

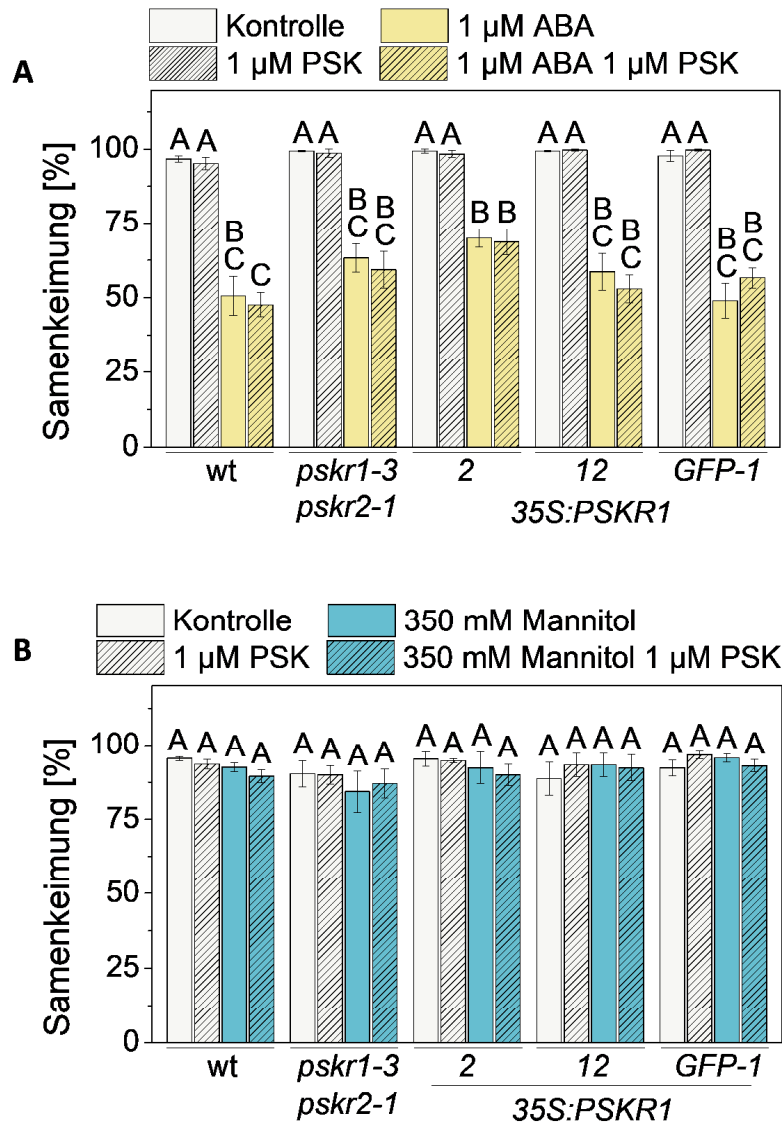


Abbildung 20: Der PSK-Signalweg interagiert nicht mit der ABA-vermittelten Repression der Keimung.

Analyse der Samenkeimung in Antwort auf ABA (A) und osmotischen Stress, hervorgerufen durch Mannitol (B), im Zusammenhang mit PSK drei Tage nach Stratifizierung. Werte sind Mittelwerte (\pm SE); Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$, $n = 3$, 3 unabhängige Experimente, bei denen jeweils 100 Samen ausgewertet wurden).

Die Keimlingsentwicklung, quantifiziert durch die Anzahl von Keimlingen mit ergrüntem Kotyledonen, war im Wildtyp gegenüber *pskr1-3 pskr2-1* unter Kontrollbedingungen verzögert. Durch PSK wurde keine zeitliche Verschiebung des Ergrünes der Kotyledonen im Wildtyp hervorgerufen (Abbildung 21 A; Anhang Abbildung 63 C, Seite 183). ABA verzögerte das Ergrünen der Kotyledonen im Wildtyp. Unter Kontrollbedingungen waren circa 50% der Wildtypkeimlinge drei Tage nach Stratifizierung ergrünt. In Antwort auf ABA waren circa 50% der Wildtypkeimlinge neun Tage nach Stratifizierung ergrünt (Anhang Abbildung 63 C, Seite 183). Bei einer Behandlung gleichzeitig mit ABA und PSK war eine weitere Verschiebung des Ergrünungszeitpunktes zu beobachten. Hier waren circa 50% der Keimlinge erst nach 14 Tagen ergrünt (Anhang Abbildung 63 B, Abbildung 63 C, Seite 183).

Diese Tendenz war bereits sieben Tage nach Stratifizierung erkennbar (Abbildung 21 B, Anhang Abbildung 63 A, Seite 183).

Bei einem Vergleich der PSK-Rezeptorüberexpressionslinien und der Rezeptormutante hinsichtlich des Ergrürens der Kotyledonen in Antwort auf ABA konnte festgestellt werden, dass diese sich zum Wildtyp unterschieden (Abbildung 21 A, Abbildung 21 C). *pskr1-3 pskr2-1* zeigte eine Ergrünungsrate von circa 50% bereits nach sieben Tagen nach Stratifizierung als Antwort auf ABA, die sich nicht durch PSK veränderte (Anhang Abbildung 63 C, Seite 183). Die PSK-Rezeptorüberexpressionslinien zeigten ein Ergrünen von 50% der Keimlinge ab Tag elf (*35S:PSKR1-12*) nach Stratifizierung, wobei eine Korrelation der Stärke der Überexpression in Zusammenhang mit der Verzögerung des Ergrürens erkennbar war (vgl. Anhang Abbildung 67, Seite 187 und Abbildung 63 C, Seite 183). Im Vergleich zu Linie *35S:PSKR1-12* zeigte die Linie *35S:PSKR1-2* nach 14 Tagen und die Linie *35S:PSKR1-GFP-1* erst danach das gleiche Ergrünungsmuster. Eine weitere Verzögerung des Ergrürens war auch in den Überexpressionslinien bei zusätzlicher Zugabe von PSK zu erkennen.

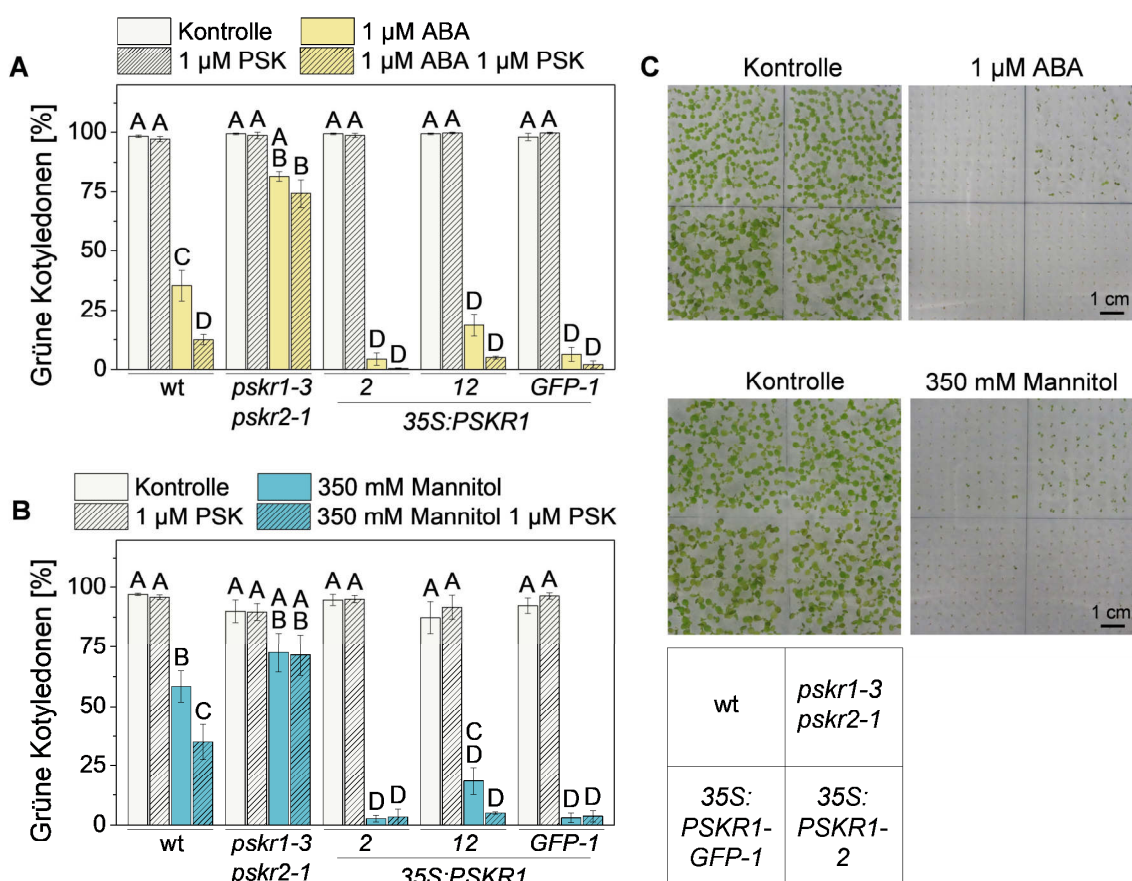


Abbildung 21: Der PSK-Signalweg verstärkt die inhibierende Wirkung von ABA auf das Ergrünen der Kotyledonen.

Ergrünen von Kotyledonen in Antwort auf ABA (A) und osmotischen Stress, hervorgerufen durch Mannitol (B), acht Tage nach Stratifizierung. Werte sind Mittelwerte (\pm SE); Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, bei denen jeweils 100 Samen ausgewertet wurden, $n = 3$).

C Phänotyp des Ergrürens der Kotyledonen bei Behandlung mit ABA oder Mannitol sieben Tage nach Stratifizierung, die Bilder zeigen repräsentative Beispiele.

Acht Tage nach Stratifizierung unterschieden sich die Ergrünungsraten der verschiedenen Genotypen in Antwort auf ABA sehr stark. Zu diesem Zeitpunkt war die Anzahl der ergrünenden Keimlinge des Wildtyps unter Kontrollbedingungen und in Antwort auf PSK gleich der von *pskr1-3 pskr2-1* und der Überexpressionslinien. In Antwort auf ABA unterschieden sich die drei jedoch signifikant (Abbildung 21 A). *pskr1-3 pskr2-1* erreichte mit 82% fast das Niveau an ergrünenden Kotyledonen wie unter Kontrollbedingungen, der Wildtyp zeigte eine starke Reduktion der Ergrünungsrate auf 35%, die durch PSK noch auf einen Wert von 12% verstärkt wurde. In den Überexpressionslinien wurde das Ergrünen der Kotyledonen durch ABA auf 4% - 19% reduziert. Durch PSK wurde keine statistisch signifikante Veränderung der Werte hervorgerufen. Diese Ergebnisse wurden als Hinweis darauf gedeutet, dass der PSK-Signalweg die ABA-Antwort der Pflanze in der frühen Keimlingsentwicklung verstärkt.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde die gleiche Analyse bei osmotischen Stressbedingungen durchgeführt. Hier konnte ein ähnliches Muster beobachtet werden (Abbildung 21 B, Abbildung 21 C, Anhang Abbildung 65 A, Abbildung 65 B, Seite 185). Auch hier waren die Unterschiede bei einem Zeitpunkt von acht Tagen nach Stratifizierung signifikant. Die Ergrünungsrate der Kotyledonen von *pskr1-3 pskr2-1* war bei osmotischem Stress nicht verändert. Im Wildtyp war bei osmotischem Stress ein verspätetes Ergrünen der Kotyledonen sichtbar, in den Überexpressionslinien ebenfalls. Eine zusätzliche Zugabe von PSK verursachte eine weitere Verzögerung des Ergrüens im Wildtyp (Abbildung 21 B, Anhang Abbildung 65 B, Seite 185).

Auch für den Prozess des Ergrüens der Kotyledonen wurde untersucht, welcher der beiden PSK-Rezeptoren für die PSK-abhängige Verzögerung verantwortlich ist. Hierzu wurden die Linien *pskr1-3* und *pskr2-1* analysiert. Hierbei fiel auf, dass nicht PSKR1 allein die PSK-abhängige Verstärkung der ABA-Antwort der Pflanze vermitteln kann (Anhang Abbildung 66 A, Abbildung 66 B, Seite 186), da beide T-DNA-Insertionslinien in Antwort auf ABA oder Mannitol kaum vom Wildtyp abwichen. Bei zusätzlicher Zugabe von PSK verhielt sich *pskr1-3* wie *pskr1-3 pskr2-1* mit einem verfrühten Ergrünen im Vergleich zum Wildtyp.

Diese Ergebnisse ließen die Annahme zu, dass die Abwesenheit der PSK-Rezeptoren in jungen Pflanzen direkt nach der Keimung nicht nur dazu führt, dass osmotischer Stress nicht wahrgenommen werden kann, sondern auch eine Resistenz dagegen vermittelt wird. Es fiel jedoch auf, dass die Kotyledonen von *pskr1-3 pskr2-1* nach 14 Tagen Behandlung mit Mannitol anfangen bräunlich zu werden, was im Gegensatz zu den Beobachtungen bei ABA-Behandlung und im Gegensatz zum Wildtyp und den Überexpressionslinien stand (Abbildung 22). Bei lang anhaltendem osmotischem Stress zeigte *pskr1-3*, wie *pskr1-3 pskr2-1*, eine bräunliche Verfärbung der Blätter (Anhang Abbildung 66 B, Seite 186). Dies bestärkte die Annahme, dass der osmotische Stress oder das ABA-Signal nicht wahrgenommen werden kann oder ABA nicht aus dem Medium aufgenommen, weniger produziert oder verstärkt abgebaut wird und dass PSKR1 und weniger PSKR2 diese Signalkette verstärkt.

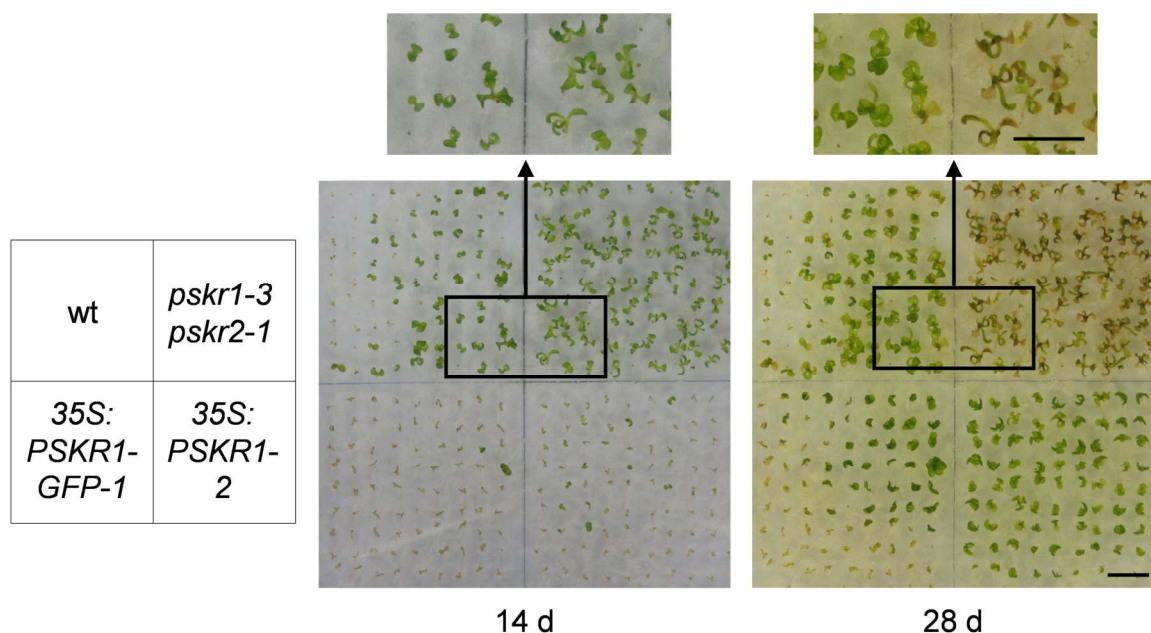


Abbildung 22: Abwesenheit der PSK-Rezeptoren bewirkt nach verfrühtem Ergrünen Braunfärbung von Keimlingen bei osmotischem Stress.

Phänotyp von Keimlingen bei Anzucht auf Medium mit 350 mM Mannitol, 14 und 28 Tage nach Stratifizierung. Rechtecke und Pfeile zeigen vergrößerte Ausschnitte an. Messbalken: 1 cm.

3.1.7 Der PSK-Signalweg begünstigt die Lateralwurzelentwicklung bei osmotischem Stress

In Arabidopsis findet bei osmotischem Stress nicht nur eine Reduktion des Sprosswachstums sondern auch eine Umstrukturierung des Wurzelsystems statt. Die Primärwurzellänge bleibt unverändert, jedoch findet eine Reduktion des Lateralwurzelswachstums statt (Deak & Malamy, 2005; Xiong *et al.*, 2006a; Bouteillé, 2011). Da in dem vorangegangenen Kapitel eine Verbindung zwischen dem PSK-Signalweg und der osmotischen Stressantwort im Spross gezeigt werden konnte, wurde zusätzlich der Einfluss auf das Wurzelwachstum und die Wurzelarchitektur untersucht.

Unter Kontrollbedingungen war die Wurzellänge von *pskr1-3 pskr2-1* im Vergleich zum Wildtyp reduziert, die der Überexpressionslinien überwiegend vergrößert. Dies deckte sich mit den Beobachtungen von Hartmann *et al.* (2013) und Ladwig *et al.* (2015). Bei mäßigem osmotischem Stress fand keine Veränderung der Primärwurzellänge im Wildtyp, in *pskr1-3 pskr2-1* und den Überexpressionslinien statt (Abbildung 23 A, Anhang Abbildung 68, Seite 187). Bei starkem osmotischem Stress war im Wildtyp das Primärwurzelwachstum im Vergleich zur Kontrolle auf 41% verringert (Abbildung 23). *pskr1-3 pskr2-1* und die Überexpressionslinien zeigten ebenfalls eine geringere Primärwurzellänge, die sich im Vergleich zum Wildtyp jedoch nicht unterschied (Abbildung 23). Der PSK-Signalweg reguliert somit bei osmotischem Stress nicht das Wachstum der Primärwurzel.

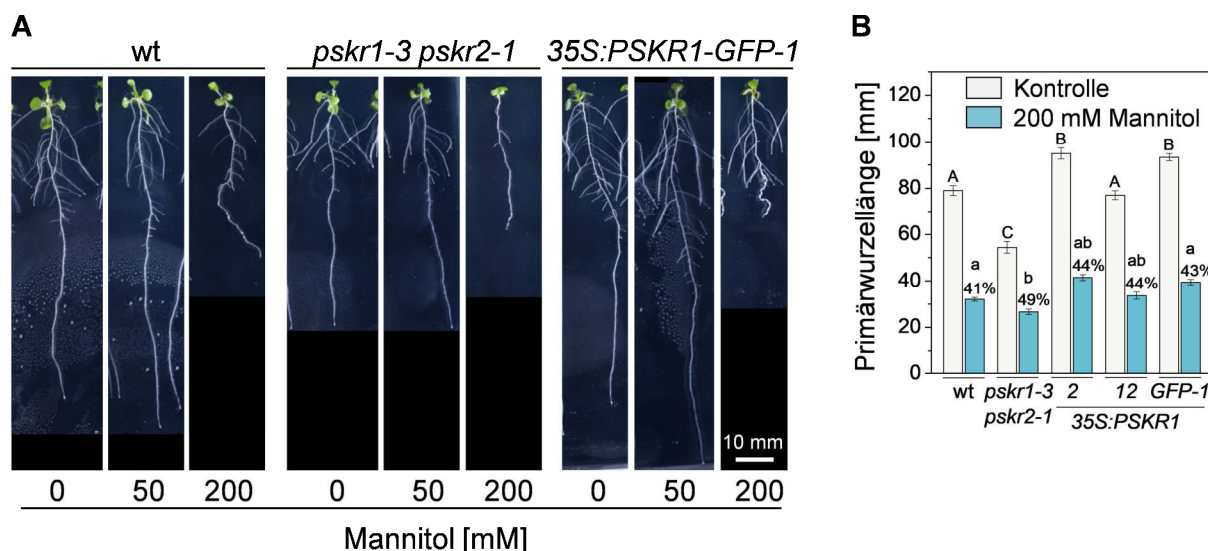


Abbildung 23: Der PSK-Signalweg reguliert die Komplexität des Wurzelsystems bei osmotischem Stress.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Mannitol transferiert und nach weiteren 7 Tagen Anzucht analysiert. Es wurden *pskr1-3 pskr2-1* und die *PSKR1*-Überexpressionslinien *35S:PSKR1-2*, *35S:PSKR1-12* und *35S:PSKR1-GFP-1* im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

A Wurzelphänotyp von *pskr1-3 pskr2-1* und der repräsentativ ausgewählten Überexpressionslinie *35S:PSKR1-GFP-1* verglichen mit dem Wildtyp. Die Bilder wurden mit einem schwarzen Hintergrund versehen um den Größenvergleich zu vereinfachen.

B Primärwurzellänge (\pm SE) von *pskr1-3 pskr2-1* und den Überexpressionslinien verglichen mit dem Wildtyp in Antwort auf Mannitol. Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Primärwurzellänge unter Kontrollbedingungen. Bei der Mannitolbehandlung erzielte Daten wurden als prozentualer Anteil des Sprossfrischgewichts der jeweiligen Linie unter Kontrollbedingungen berechnet und die statistischen Unterschiede der behandelten Linien mit Kleinbuchstaben dargestellt (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n = 24$).

Es fiel auf, dass die Architektur des Wurzelsystems in *pskr1-3 pskr2-1* bei starkem osmotischem Stress in ihrer Komplexität reduziert wirkt und in den Überexpressionslinien erhöht (Abbildung 23 A). Aus diesem Grund wurde untersucht, durch welche architektonische Veränderung sich die Reduktion der Komplexität des Wurzelsystems manifestiert. Zunächst wurden die Anzahl lateraler Wurzelorgane, also die Zahl der Lateralwurzelprimordien und nicht ausgewachsener Lateralwurzeln sowie die Anzahl der ausgewachsenen Lateralwurzeln bestimmt. Der Verlust der PSK-Rezeptoren führte unter Kontrollbedingungen zu einer Reduktion der Anzahl lateraler Wurzelorgane und eine Überexpression zu mehr Lateralwurzeln. Bei osmotischem Stress war, außer im Wildtyp, kein signifikanter Unterschied in der Dichte der Organe eines Genotyps im Vergleich zu der jeweiligen Dichte unter Kontrollbedingungen sichtbar (Abbildung 24 B). Dies ließ die Annahme zu, dass die sichtbare Reduktion der Komplexität des Wurzelsystems bei Verlust der PSK-Rezeptoren bei osmotischem Stress nicht auf eine verminderte Anzahl von lateralen Wurzelorganen zurückzuführen ist.

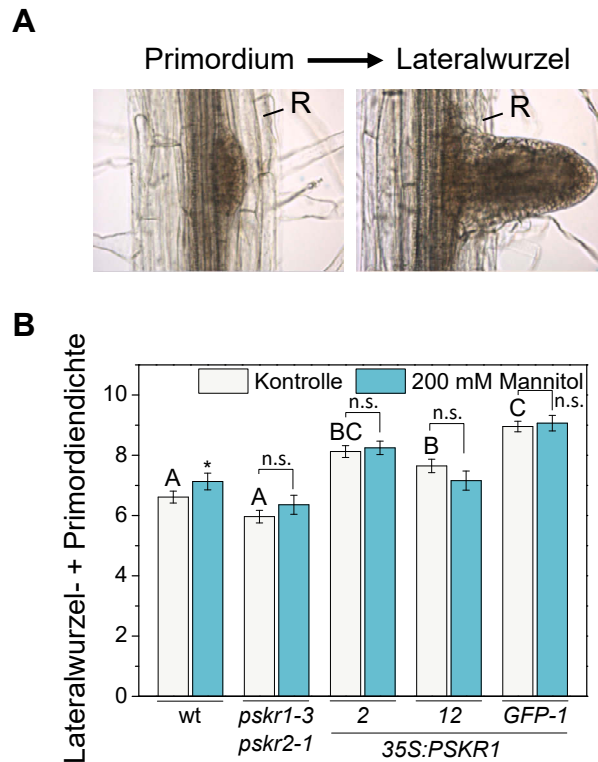


Abbildung 24: Dichte lateraler Wurzelorgane ist unabhängig von osmotischem Stress und dem PSK-Signalweg.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 200 mM Mannitol versetzt worden war und nach weiteren sieben Tagen Anzucht analysiert. Es wurden der Wildtyp, *pskr1-3 pskr2-1* und die Überexpressionslinien *35S:PSKR1-2*, *35S:PSKR1-12* und *35S:PSKR1-GFP-1* analysiert.

A Lateralwurzelwachstum unter Kontrollbedingungen, links: Lateralwurzelprimordium (nicht ausgewachsene Lateralwurzeln), rechts: Lateralwurzel (Rhizodermis (R) penetriert). Pfeil zeigt die Entwicklung von Lateralwurzelprimordium zur Lateralwurzel an.

B Summe der Lateralwurzelprimordien und Lateralwurzeln (\pm SE) pro cm Primärwurzellänge. Asterisk zeigt statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Antwort auf osmotischen Stress eines Genotyps an, Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede unter Kontrollbedingungen an (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n = 24$).

Für eine Vereinfachung der folgenden Analysen wurden die lateralen Wurzelorgane in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe waren Primordien und umfasste die nach Casimiro *et al.* (2003) aufgezeigten Stadien der Lateralwurzelentwicklung II bis VI. Die zweite Gruppe umfasste alle Lateralwurzeln, die die Rhizodermis penetriert hatten (Abbildung 24 A), also die Stadien VII und VIII. Die Anzahl der Primordien und Lateralwurzeln wurde gesondert bestimmt und die verschiedenen Genotypen jeweils verglichen (Abbildung 25).

Unter Kontrollbedingungen war die Anzahl der Primordien in den *PSKR1*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp und *pskr1-3 pskr2-1* erhöht (Abbildung 25 A). Unter osmotischen Stressbedingungen veränderte sich die Primordien-dichte im Wildtyp im Vergleich zu der Dichte unter Kontrollbedingungen nicht. In *pskr1-3 pskr2-1* war eine Zunahme an Lateralwurzelprimordien zu verzeichnen, wohingegen die Dichte in den Überexpressionslinien abnahm.

Die Lateralwurzeldichte von *pskr1-3 pskr2-1* unter Kontrollbedingungen unterschied sich nicht zu der des Wildtyps. Die Überexpressionslinien zeigten eine erhöhte Anzahl an Organen pro Wurzellänge im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 25 B). Bei osmotischem

Stress war eine gegenteilige Tendenz im Vergleich zur Primordiendichte bei Stress zu verzeichnen. Die Dichte der Lateralwurzeln war im Wildtyp sowie in den Überexpressionslinien erhöht und in *pskr1-3 pskr2-1* geringer im Vergleich zur Kontrolle. Dies lässt darauf schließen, dass der PSK-Signalweg unter starkem osmotischem Stress das Auswachsen von Lateralwurzeln fördert, wobei die Summe der lateralen Wurzelorgane gleichbleibt.

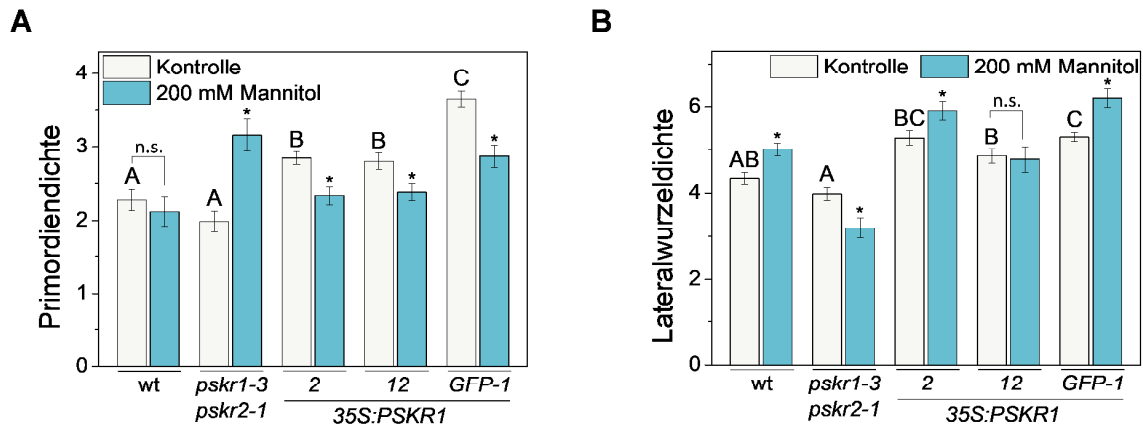


Abbildung 25: PSK-Rezeptoren fördern Lateralwurzelnwachstum unter osmotischen Stressbedingungen.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 200 mM Mannitol versetzt worden war und nach weiteren sieben Tagen Anzucht analysiert. Es wurden *pskr1-3 pskr2-1* und die Überexpressionslinien *35S:PSKR1-2*, *35S:PSKR1-12* und *35S:PSKR1-GFP-1* im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Asteris zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an, Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede unter Kontrollbedingungen an (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n = 24$).

A Primordiendichte (± SE) pro cm Primärwurzellänge (nicht ausgewachsene Lateralwurzeln).

B Lateralwurzelndichte (± SE) pro cm Primärwurzellänge (Rhizodermis penetriert).

3.2 Phytosulfokin reguliert die Aktivität von Transkriptionsfaktor- und entwicklungsspezifischen Genen

Die stromabwärts von PSK agierenden Signalwege, die zu einem Wachstum der Pflanze beitragen, sind bisher nicht aufgeklärt. Um Gene identifizieren zu können, deren Aktivität durch PSK reguliert wird, war ein Microarray zur Detektion von Expressionsveränderungen durchgeführt worden (Daten zur Verfügung gestellt von M. Sauter, unveröffentlicht). Als pflanzliches Material für diesen Versuch hatten die Wurzeln fünf Tage alter Keimlinge gedient. Für dieses Wachstumsstadium und Organ ist eine wachstumsfördernde Wirkung von PSK beschrieben (Kutschmar *et al.*, 2009). Relative Genexpressionsunterschiede des Wildtyps im Vergleich zu der *tpst-1*-Mutante, in der die Sulfatierung von Peptiden unterbunden ist (Komori *et al.*, 2009), wurden unter Kontrollbedingungen bestimmt, sowie zusätzlich die Expressionsunterschiede, die bei einer Behandlung der Mutante mit PSK im Vergleich zum Wildtyp und zur unbehandelten Mutante auftraten. Genexpressionen wurden als induziert gewertet, wenn sie in Relation zur Vergleichslinie/-behandlung größer gleich das Zweifache waren und als herunterreguliert, wenn sie Werte kleiner gleich 0,5 aufwiesen. So konnten zum einen Regulationen von Genexpressionen identifiziert werden, die durch sulfatierte Peptide hervorgerufen werden und zusätzlich analysiert werden, ob diese Regulationen durch PSK allein, durch andere sulfatierte Peptide oder durch beides verursacht werden. Aufgrund des gewählten Versuchsaufbaus für den Microarray, in dem die Keimlinge über mehrere Tage mit PSK behandelt worden waren, sind die hier analysierten Expressionsdaten als eine späte PSK-Antwort zu sehen und/oder als Signalkettenmitglieder, die in einen stetigen Prozess der PSK-Antwort in der Wurzel involviert sind. Es wurde angenommen, dass TFs, deren Gene in diesem Versuchsaufbau als PSK-reguliert detektiert wurden, in der PSK-vermittelten Wachstumsantwort agieren könnten. Um diese These zu überprüfen, wurden diese Gene funktionell analysiert.

3.2.1 PSK hat einen überwiegend inhibierenden Effekt auf die Expression von Transkriptionsfaktor genen

Um mögliche stromabwärts der PSK-Rezeptoren agierende Signalketten ermitteln zu können, wurden zunächst alle TF-Gene identifiziert die durch die TPST sulfatiert werden (Abbildung 26). In der Wurzel waren 55 derartige Gene reguliert, von denen 29 in ihrer Expression reprimiert und 26 induziert waren. Nicht für alle kodierten Proteine war eine TF-Aktivität experimentell nachgewiesen. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie gehören sie jedoch zu Familien, deren Mitglieder für eine transkriptionsverändernde Aktivität bekannt sind. Ihr DNA-Bindevermögen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Der Einfachheit halber wird im weiteren Verlauf dennoch von TFs gesprochen. Genaue Auflistungen der durch sulfatierte Peptide in ihrer Transkription beeinflussten Gene sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 18, Seite 206, Tabelle 19, Seite 207).

Die Expression von etwa einem Drittel der 55 TF-Gene wurde durch PSK reguliert (Abbildung 26). 13 dieser Gene wurden durch PSK reprimiert, wovon zwei ausschließlich durch PSK und keine anderen sulfatierten Peptide reguliert wurden. In ihrer Expression reprimiert wurden lediglich drei TF-Gene. Dies geschah sowohl durch PSK als auch durch andere sulfatierte Peptide.

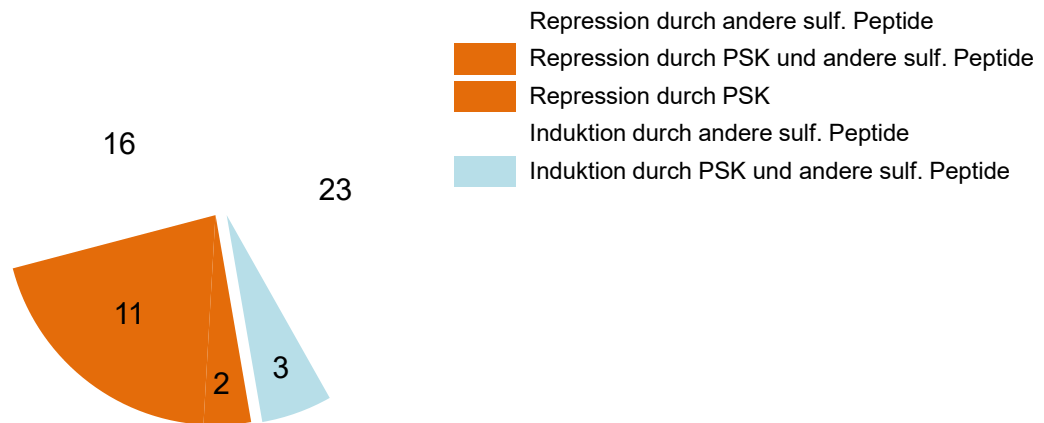


Abbildung 26: Einteilung der durch TPST-sulfatierte Peptide in ihrer Expression beeinflussten Transkriptionsfaktorgene.

Gezeigt ist die Anzahl der durch sulfatierte Peptide in ihrer Expression regulierten TF-Gene als Ergebnisse eines Microarrays (M. Sauter, unveröffentlicht), in dem Wurzeln fünf Tage alter Wildtyp und *tpst-1*-Keimlinge, mit oder ohne PSK-Behandlung, als Material dienten (vgl. Anhang Tabelle 18, Seite 206, Tabelle 19, Seite 207). orange: Anzahl durch sulfatierte Peptide reprimierter Gene, hell: durch sulfatierte Peptide exklusive PSK reprimiert, mittel: durch sulfatierte Peptide inklusive PSK reprimiert, dunkel: durch PSK als einziges sulfatiertes Peptid reprimiert; blau: Anzahl durch sulfatierte Peptide induzierter Gene, hell: durch sulfatierte Peptide exklusive PSK induziert, mittel: durch sulfatierte Peptide inklusive PSK induziert.

Die Ergebnisse des Microarrays bezüglich einer PSK-abhängigen Expressionsänderung von TF-Genen wurden von N. Stührwohldt (AG Sauter) exemplarisch durch Anwendung quantitativer Realtime-PCR (qRT-PCR) auf ihre Gültigkeit überprüft (Anhang Abbildung 69, Seite 208). Als Material dienten Wurzelspitzen von *pskr1-3 pskr2-1* und einer *PSKR1*-Überexpressionslinie, die auf Medium, versetzt mit 1 μ M PSK, angezogen worden war. Es konnte gezeigt werden, dass die im Microarray als durch PSK induziert identifizierten Kandidaten auch in der qRT-PCR-Analyse die gleichen Tendenzen aufwiesen (*AGAMOUS-LIKE 17, AGL17; AGAMOUS-LIKE 21, AGL21; MYB DOMAIN PROTEIN 88, MYB88*; Anhang Abbildung 69 A, Seite 208, vgl. Tabelle 5). Auch drei Kandidaten, die eine Repression der Expression aufwiesen, konnten bestätigt werden (*NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 15, NAC015/BEARSKIN 1, BRN1; NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 31, NAC031/CUP-SHAPED COTYLEDON 3, CUC3; basic HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 129, bHLH129*; Anhang Abbildung 69 B, Seite 208, vgl. Tabelle 5). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass die Daten des Microarrays verlässlich sind. Somit lässt sich sagen, dass PSK die Expression von 16 TFs beeinflusst, wovon 13 der Gene in ihrer Expression reprimiert werden.

3.2.2 PSK-regulierte Transkriptionsfaktoren gehören zu unterschiedlichen Transkriptionsfaktorfamilien und erfüllen unterschiedliche Funktionen

Die durch PSK regulierten TFs gehören unterschiedlichen TF-Familien an (Tabelle 5). Die Verteilung zeigte keine auffällige Tendenz der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Familie. Jeweils zwei bis vier (fünf) Kandidaten ließen sich folgenden fünf Großfamilien/-gruppen zuordnen: MADS-Box-Proteine, Proteine mit Homöodomänen und/oder Zink Finger-Motiven, NAC-TFs und AP2/EREBP-Proteine. Jeweils ein Kandidat gehörte zu der Gruppe der MYB-Domänen- und der bHLH-Proteine (*basic HELIX-LOOP-HELIX*).

Tabelle 5: Transkriptionsfaktorgene, deren Expression durch PSK reguliert wird.

Ergebnisse eines Microarrays (M. Sauter, unveröffentlicht), in dem Wurzeln fünf Tage alter Wildtyp- und *tpst-1*-Keimlinge, mit oder ohne PSK-Behandlung, als Material dienten. Ein Ergebnis wurde als Induktion (blau) bei einem Wert ≥ 2 , und als Repression (orange) bei einem Wert $\leq 0,5$ gewertet. Asteriske weisen auf in dieser Arbeit untersuchte* oder nur klonierte* TFs. *HB24* gehört sowohl zu den HD- als auch den ZF-TFs.

Transkriptionsfaktorfamilie	Genlokus	Genbezeichnung	Relative Expression		
			<i>tpst-1</i> /wt	<i>tpst-1</i> +PSK/wt	<i>tpst-1</i> +PSK/ <i>tpst-1</i>
MADS-Box	At2g22630	<i>AGL17</i> *	0,36	0,75	2,12
	At4g37940	<i>AGL21</i> *	0,28	0,71	2,57
AP2/EREBP	At3g16770	<i>ERF72/EBP/RAP2.3</i> *	4,56	1,97	0,43
	At5g25190	<i>ERF003/ESE3</i>	3,05	1,45	0,48
	At5g61600	<i>ERF104</i>	1,09	0,49	0,45
HB	At2g18350	<i>HB24/ZHD6</i> *	2,04	0,91	0,45
	At4g04890	<i>PDF2</i> *	4,25	1,53	0,36
Zinkfinger	At1g21340	<i>DOF1.2</i> *	3,08	1,38	0,45
	At1g27730	<i>STZ/ZAT10</i> *	3,27	0,87	0,27
	At2g18490	<i>GAZ</i> *	1,68	0,78	0,46
	At5g49520	<i>WRKY48</i> *	3,10	1,24	0,40
NAC	At1g33280	<i>NAC015/BRN1</i> *	3,10	1,38	0,44
	At1g76420	<i>NAC031/CUC3</i> *	2,77	1,28	0,46
	At4g01540	<i>NAC068/NTM1/NTL12</i> *	2,11	0,80	0,38
andere	At2g02820	<i>MYB88</i> *	0,42	0,90	2,17
	At2g43140	<i>bHLH129</i> *	2,86	0,63	0,22

Zur Analyse, ob es für die PSK-regulierten TFs Überschneidungen der bekannten Funktionen gibt, wurden die Genontologiefaktoren der Gene, erhalten aus TAIR Bulky (Berardini *et al.*, 2015), ergänzt und bestätigt durch eine Literaturrecherche (Anhang Seite 188 ff.), auf Gemeinsamkeiten hin überprüft. Die jeweils herangezogenen Publikationen sind in Tabelle 20 (Anhang, Seite 208) aufgeführt. Für 14 der Gene waren Daten verfügbar, aufgrund derer sich zwei Kategorien ergaben. Hierbei handelte es sich um (Stress-)Antworten auf abiotische und/oder biotische Stimuli sowie Entwicklungsprozesse (Tabelle 6). Für *HB24* (*HOMEBOX*

PROTEIN 24/ZINC FINGER HOMEODOMAIN 6, ZHD6) und *DOF1.2 (DNA-BINDING WITH ONE FINGER DOMAIN PROTEIN 1.2)* waren keine Daten vorhanden.

Tabelle 6: PSK-regulierte Transkriptionsfaktoren wirken in verwandten Prozessen.

Genontologievergleichsdaten PSK-regulierter TF-Gene aus TAIR Bulky (violett) (Berardini *et al.*, 2015), kombiniert mit Publikationsdaten (grün). + = eingruppiert, - = nicht in Gruppe enthalten. Dargestellt sind ausschließlich Faktoren, die auf mehr als eins der Gene zutreffen. Für *HB24* und *DOF1.2* waren keine Daten verfügbar.

Transkriptionsfaktorfamilie	MADS		HB		Zink Finger			NAC		AP2/EREBP		andere				
Genlokus	At2g22630	At4g37940	At4g04890	At2g18350	At1g21340	At1g27730	At2g18490	At5g49520	At1g33280	At1g76420	At4g01540	At3g16770	At5g25190	At5g61600	At2g02820	At2g43140
Genbezeichnung	AGL17	AGL21	PDF2	HB24/ZHD6	DOF1.2	STZ/ZAT10	GAZ	WRKY48	NAC015/BRN1	NAC031/CUC3	NAC068/NTM1/NTL12	ERF72/EBP/RAP2.3	ERF003/ESE3	ERF104	MYB88	bHLH129
(Stress-)Antwort auf abiotische oder biotische Stimuli	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Entwicklungsprozesse	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

In der Kategorie Entwicklungsprozesse waren alle TFs vertreten, für die Daten verfügbar waren, wobei *PDF2 (PROTODERMAL FACTOR 2)*, *GAZ (GA- AND ABA-RESPONSIVE ZINC FINGER)*, *NAC015* und *NAC031* bisher ausschließlich in dieser Kategorie angesiedelt sind. Ansonsten gab es für alle Kandidaten Überschneidungen in ihrer Zuordnung, was darauf zurückzuführen ist, dass Entwicklungsprozesse oft eine Antwort auf abiotische/biotische Stimuli oder auf eine Stressantwort sein können. Somit wirken alle PSK-regulierten TFs in Entwicklungsprozessen der Pflanze, induziert durch äußere und/oder innere Stimuli.

3.2.3 Funktionsanalyse PSK-regulierter Transkriptionsfaktoren bezüglich des Primärwurzelwachstums

Da durch *in silico* Analysen kein eindeutiger Hinweis erlangt werden konnte, welche der identifizierten Gene eine Rolle in der PSK-vermittelten Wachstumsantwort spielen könnten, wurde eine mögliche Funktion im PSK-Signalweg *in planta* untersucht. Zu diesem Zweck wurden für 14 der 16 PSK-regulierten Gene Überexpressionslinien hergestellt (Tabelle 5). Die Überexpressionsvektoren wurden sowohl in den Wildtyp- als auch in den *tpst-1*-Hintergrund eingebracht. Diese Mutante wurde gewählt, da sie eine erhöhte Sensitivität gegenüber PSK im Vergleich zum Wildtyp aufweist (Hartmann *et al.*, 2013). Deshalb wurde davon ausgegangen, dass bei einer möglichen Interaktion mit dem PSK-Signalweg eine

Überexpression in diesem Mutantenhintergrund eindeutig sichtbare Ergebnisse zeigen würde. Die Überexpressionslinien wurden zusammen mit T-DNA-Insertionslinien, soweit vorhanden, auf eine veränderte PSK-abhängige Wurzelelongation überprüft. Nicht untersucht wurden die Gene *ESE3* (*ETHYLENE AND SALT INDUCIBLE 3*) und *ERF104* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 104*).

3.2.3.1 Die MADS-Box Transkriptionsfaktorgene *AGL17* und *AGL21*

In der Familie der MADS-Box-TFs wird die Expression zweier Gene durch PSK induziert. Hierbei handelt es sich um *AGL17* (At2g22630) und *AGL21* (At4g37940) (Abbildung 27), für die eine auffallend starke Expression im Bereich der Wurzel beschrieben ist (Burgeff *et al.*, 2002; Czechowski *et al.*, 2004) (siehe Anhang Seite 188 ff.). Aus diesem Grund schienen *AGL17* und *AGL21* vielversprechende Kandidaten bezüglich einer möglichen Rolle in der PSK-vermittelten Wurzelelongation zu sein.

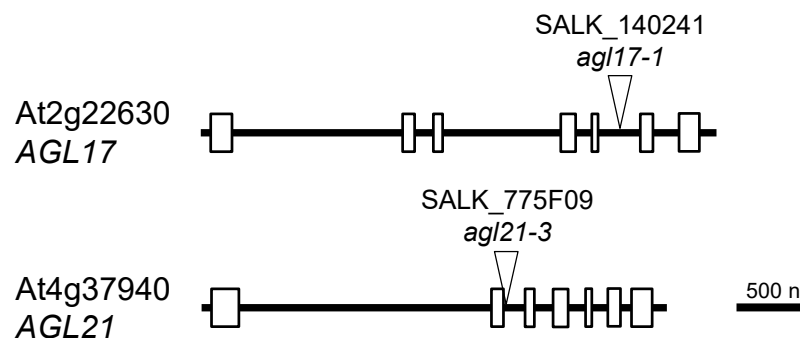


Abbildung 27: Exon-Intron-Struktur der MADS-Box-Gene *AGL17* und *AGL21*.

Weißer Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Die T-DNA-Insertionen der Linien *agl17-1* und *agl21-3* sind als Dreiecke dargestellt.

3.2.3.1.1 *AGL17* kann das Primärwurzelswachstum verstärken

Bei der Herstellung von Überexpressionslinien für *AGL17* wurde eine hohe Transformationsrate erzielt und je zwölf Transformanten für den Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund für weitere Analysen verwendet. Nach einer Selektion auf homozygotes Saatgut wurden jeweils sechs unabhängige Linien auf eine Überexpression von *AGL17* getestet, diese verifiziert (Abbildung 28 A) und die Linien in Primärwurzelswachstumsanalysen eingesetzt. Als T-DNA-Insertionslinie wurde *agl17-1* (Han *et al.*, 2008) ausgewählt (Abbildung 27), eine homozygote Integration für diese Linie bestätigt und eine Transkriptreduktion nachgewiesen (Abbildung 28 A).

Eine Regulation der Wurzelentwicklung durch *AGL17* ist bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit konnte bei der Untersuchung der *AGL17*-überexprimierenden Linien beobachtet werden, dass die Wurzeln der Keimlinge unter Kontrollbedingungen tendenziell, jedoch meist nicht statistisch signifikant, länger waren als die des Wildtyps (Abbildung 28 B).

Im *tpst-1*-Hintergrund hatte eine Überexpression des Gens den gleichen Effekt wie im Wildtyphintergrund. Auch hier war die Wurzellänge schwach, aber nicht statistisch signifikant, erhöht (Abbildung 28 B). Eine Korrelation der Stärke der Überexpression mit der Länge der Primärwurzeln war für beide Hintergründe nicht erkennbar. Die T-DNA-Insertionslinie *agl17-1* wies eine Reduktion der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen auf (Abbildung 28 B). Sowohl die T-DNA-Insertionslinie als auch die Überexpressionslinien zeigten einen Längenzuwachs in Antwort auf PSK, wie er im Wildtyp zu beobachten ist (Abbildung 28 B). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass AGL17 das Primärwurzelnwachstum unterstützt. Sollte AGL17 im PSK-Signalweg agieren, ist dies jedoch nicht der zentrale TF für das PSK-vermittelten Wurzelwachstum.

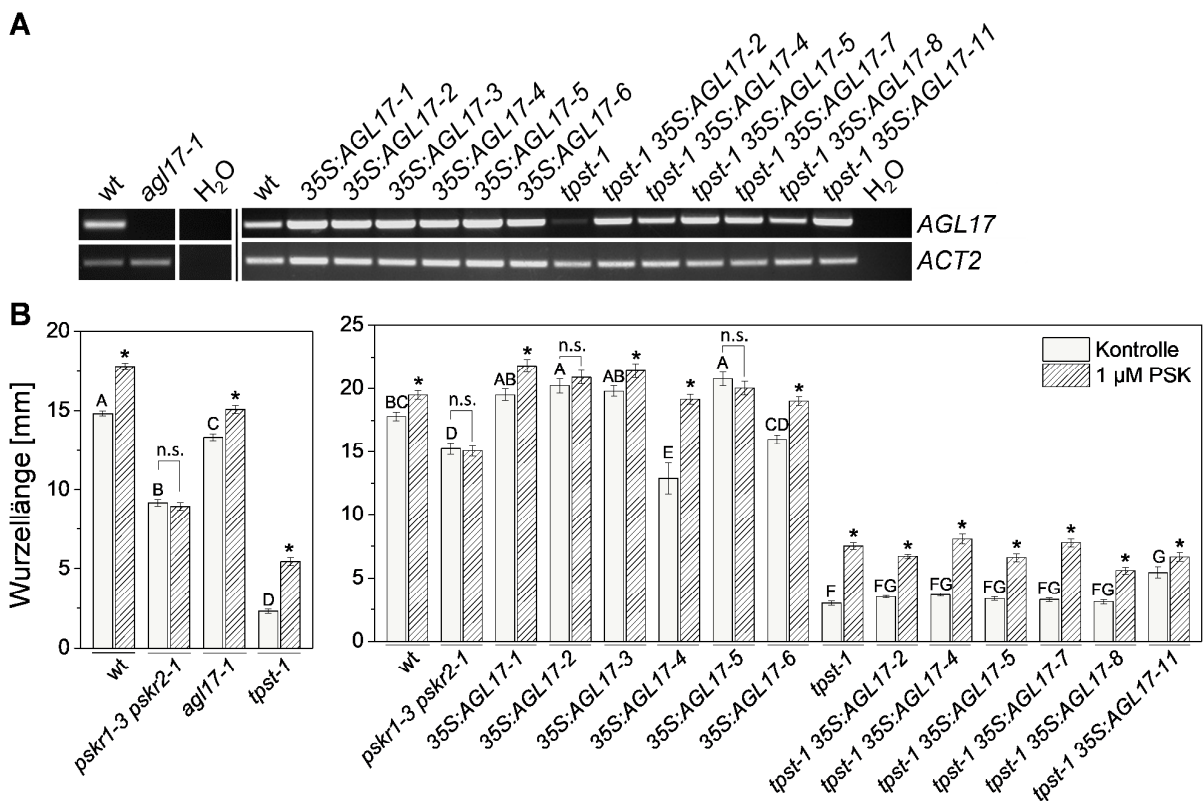


Abbildung 28: AGL17 hat einen schwachen Einfluss auf das Primärwurzelnwachstum.

A Expressionsanalyse einer *AGL17* T-DNA-Insertionslinie (*agl17-1*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (*t*-Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente für T-DNA-Insertion, $n \geq 63$; 2 unabhängige Experimente für Überexpressionslinien, $n \geq 35$).

3.2.3.1.2 AGL21 beeinflusst nicht das Primärwurzelwachstum, jedoch den Blühzeitpunkt

Bei einem Einsatz von *AGL21*-Überexpressionsvektoren konnte für den Wildtyp-Hintergrund eine hohe Transformationsrate erzielt werden, sodass von zwölf Transformanten sechs zur weiteren Selektion eingesetzt wurden. Von diesen konnten in der T₃-Generation vier homozygote Linien identifiziert werden, sodass diese auf eine Überexpression getestet wurden und diese bestätigt werden konnte (Abbildung 29 A). Im *tpst-1*-Hintergrund wurden sieben Transformanten generiert, von denen sechs auf eine BASTA®-Resistenz selektiert wurden. Vier unabhängige Linien der T₃-Generation wiesen diese Resistenz auf, zeigten eine verstärkte *AGL21*-Expression (Abbildung 29 A) und wurden auf ein verändertes Wurzelwachstum untersucht. Zusätzlich wurde die T-DNA-Insertionslinie *agl21-3* (diese Arbeit) verwendet, die eine Integration im zweiten Exon des Gens aufweist (Abbildung 27). War diese homozygot, führte dies zu einer Repression der Expression des Gens (Abbildung 29 A).

Wie zuvor durch Yu *et al.* (2014) beschrieben, konnte auch in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied bezüglich der Primärwurzellänge der *AGL21*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp oder der *tpst-1*-Mutante festgestellt werden (Abbildung 29 B). Die *AGL21*-Überexpression führte, wie bereits für eine verstärkte Expression von *AGL17* beschrieben (Han *et al.*, 2008), zu einer verfrühten Blüte (Anhang Abbildung 70, Seite 210). Dieser Phänotyp war sowohl im Wildtyp- als auch im *tpst-1*-Hintergrund zu beobachten. Die Linie *agl21-3* zeigte, wie die durch Yu *et al.* (2014) beschriebenen T-DNA-Insertionslinien, keine Veränderung der Primärwurzellänge im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 29 B). Auch in Antwort auf PSK war die induzierte Primärwurzelelongation vergleichbar mit der des Wildtyps. Hieraus wurde geschlossen, dass *AGL21* als alleiniger TF nicht im Wachstum der Primärwurzel agiert, jedoch den Blühzeitpunkt beeinflusst.

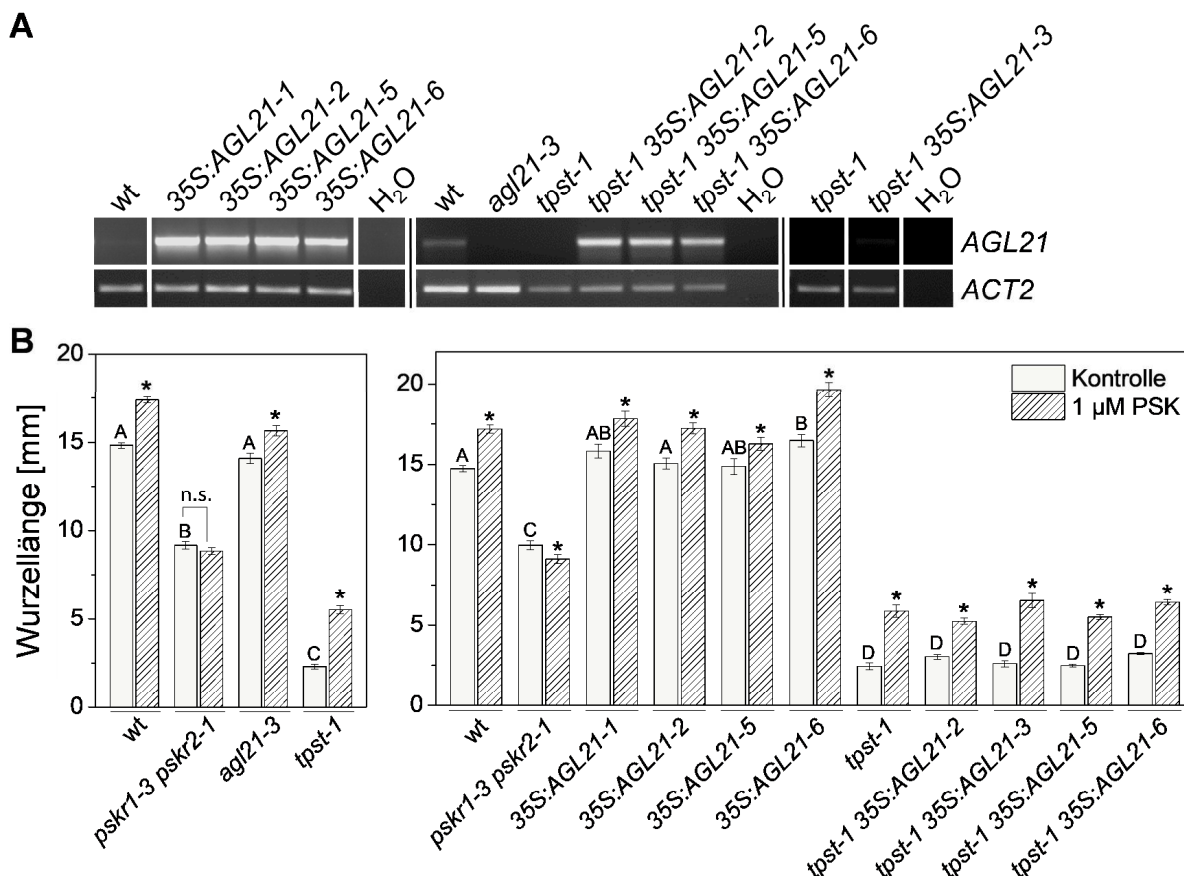


Abbildung 29: AGL21 steuert nicht das Primärwurzelwachstum.

A Expressionsanalyse einer *AGL21* T-DNA-Insertionslinie (*agl21-3*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (*t*-Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente für T-DNA-Insertion, $n \geq 72$; 2 unabhängige Experimente für Überexpressionslinien, $n \geq 24$).

3.2.3.1.3 AGL17 und AGL21 agieren gemeinsam in der PSK-Antwort

Da sowohl *AGL17* als auch *AGL21* im Microarray durch PSK und andere sulfatierte Peptide hochreguliert waren, ihre Aminosäuresequenz sehr ähnlich ist (Burgeff *et al.*, 2002; De Folter *et al.*, 2005) und Einzelmutationen bezüglich einer PSK-vermittelten Wurzelelongation keinen veränderten Phänotyp aufwiesen, konnte eine mögliche Redundanz der beiden Kandidaten nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob der Verlust beider Gene einen Einfluss auf das Wurzelwachstum hat. Dazu wurde eine zweifache T-DNA-Insertionslinie (*agl17-1 agl21-3*) aus den zuvor beschriebenen Einzel-T-DNA-Insertionslinien erzeugt (vgl. Abbildung 27, Abbildung 30 A). Die Primärwurzellänge der Doppel-*knockout*-Linie war nicht signifikant unterschiedlich zu der des Wildtyps (Abbildung 30 B), im Gegensatz zu *agl17-1*-Keimlingen mit verkürzter Wurzel (Abbildung 28 B). Jedoch war bei der Doppelmutation keine signifikante Antwort auf PSK sichtbar (Abbildung 30 B), anders als in den Einzel-T-DNA-Insertionslinien, die beide

verstärktes Wachstum in Antwort auf PSK zeigten (Abbildung 28 B, Abbildung 29 B). Dies wurde zum einen als Hinweis darauf gewertet, dass die in dieser Arbeit zuerst untersuchte T-DNA-Insertionslinie *agl21-3* tatsächlich eine funktionelle Veränderung des Genprodukts zur Folge hat und zum anderen, dass AGL17 und AGL21 in den PSK-Signalweg eingebunden sein könnten, eine Interpretation der Daten jedoch schwierig ist.

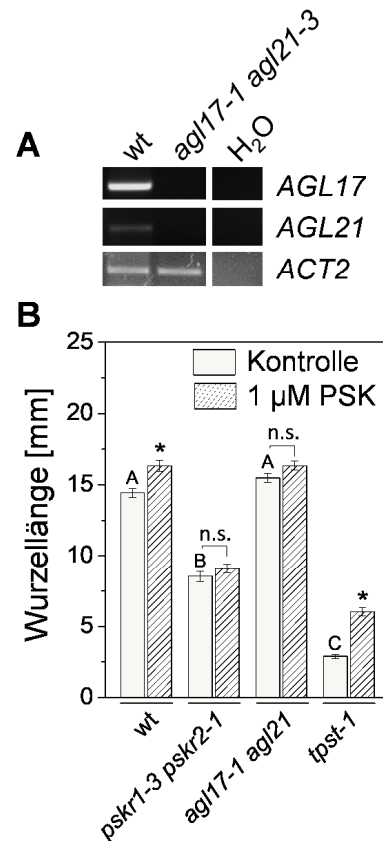


Abbildung 30: Abwesenheit von AGL17 und AGL21 bewirkt Verlust der Sensitivität gegenüber PSK.

A Expressionsanalyse einer T-DNA-Doppelinsertion von *AGL17* und *AGL21* (*agl17-1 agl21-3*).

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 72$).

3.2.3.2 Die Homöodomänentranskriptionsfaktoren PFD2 und HB24

Die Familie der HD-TFs beinhaltet zwei durch PSK reprimierte Gene, *PDF2* (At4g04890) und *HB24* (At2g18350) (Abbildung 31), die zu unterschiedlichen Untergruppen der HD-Familie gehören (siehe Anhang Seite 190 ff.). PDF2 wirkt zusammen mit seinem Homolog AtML1 (*Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1, At4g21750) in der Spezifikation der Epidermisidentität im Spross (Abe *et al.*, 2003b; Kamata *et al.*, 2013). In der Wurzel wird das Wachstum in der Epidermis durch PSK reguliert (Hartmann *et al.*, 2013). Eine Interaktion des TFs im gleichen Gewebe mit dem PSK-Signalweg wurde daher als möglich angesehen. Für HB24 ist bisher keine Funktion beschrieben. Laut eFP Browser (Winter *et al.*, 2007) ist seine

Expression im Spross am stärksten, insbesondere im Bereich des Apikalmeristems, in den Stomata, den Petioli, den Blättern und Antheren. Auch in Embryonen wurde eine Expression nachgewiesen.

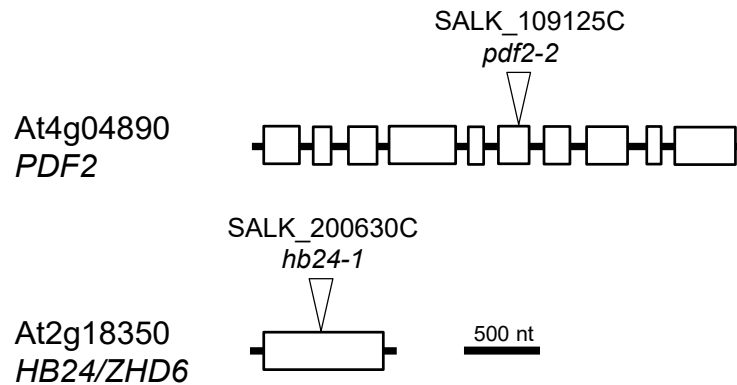


Abbildung 31: Exon-Intron-Struktur der Homöodomäentranskriptionsfaktorgene *PDF2* und *HB24*.

Weißer Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Die T-DNA-Insertionen der Linien *pdf2-2* und *hb24-1* sind als Dreiecke dargestellt.

3.2.3.2.1 *PDF2* reguliert das Wurzelwachstum und die PSK-vermittelte Wurzelelongation - sein Homolog *AtML1* nicht

Für eine funktionelle Untersuchung von *PDF2* wurden elf Überexpressionslinien im Wildtyphintergrund generiert, von denen vier in der T₃-Generation homozygot bezüglich einer BASTA®-Resistenz waren und eine Überexpression des Gens aufwiesen (Abbildung 32 A). Im *tpst-1*-Hintergrund wurden drei Transformanten selektiert, die positiv auf eine Homozygotie der verwendeten Resistenz und eine Überexpression getestet wurden. Zur Analyse des Wurzelwachstums in Abwesenheit von *PDF2* wurde die T-DNA-Insertionslinie *pdf2-2* (San-Bento *et al.*, 2013) auf Homozygotie der Insertion getestet und die Repression der Expression des Gens bestätigt (Abbildung 32 A). Die gleichen Untersuchungen wurden für das *PDF2*-Homolog *AtML1* und der T-DNA-Insertionslinie *atml1-3* (Ogawa *et al.*, 2015) durchgeführt.

Eine veränderte Expression von *PDF2* hatte nicht nur eine Auswirkung auf das Spross-, sondern auch auf das Wurzelwachstum. Bisher wurde keine Veränderung des Wurzelphänotyps bei einer Repression von *PDF2* beschrieben. Hier konnte beobachtet werden, dass eine Repression der Genaktivität ein verringertes Wachstum der Primärwurzel hervorruft, das jedoch nicht so stark reduziert ist wie in *pskr1-3 pskr2-1*. Eine Überexpression hingegen bewirkte ein stärkeres Wachstum der Wurzel (Abbildung 32 B). Im Wildtyphintergrund fand bei einer Überexpression von *PDF2* kein Längenzuwachs in Antwort auf PSK statt. Dies wiederum war jedoch in der *pdf2-2*-Linie und einer Überexpression im *tpst-1*-Hintergrund sichtbar. Die Überexpressionslinie im *tpst-1*-Hintergrund zeigten keine statistisch signifikante Veränderung der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen (Abbildung 32 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass PSK und *PDF2* beide

eine Elongation der Primärwurzel bewirken, es jedoch einen *Feedbackloop*, in dem PSK die Expression von *PDF2* negativ beeinflusst, geben könnte.

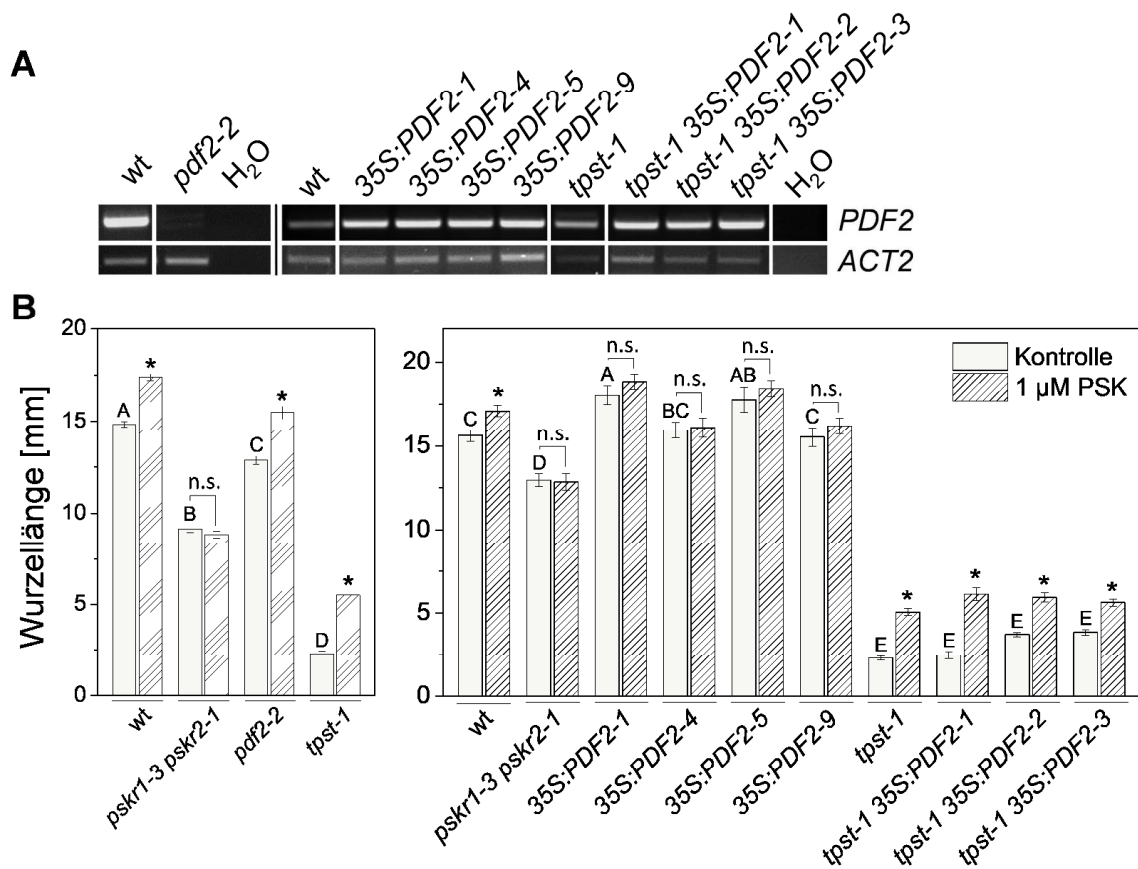


Abbildung 32: PDF2 reguliert das Wurzelwachstum und interagiert mit dem PSK-Signalweg.

A Expressionsanalyse einer *PDF2* T-DNA-Insertionslinie (*pdf2-2*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (*t*-Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente für T-DNA-Insertion, $n \geq 72$; 2 unabhängige Experimente für Überexpressionslinien, $n \geq 39$).

Um zu überprüfen, ob das nahverwandte und teilweise redundant agierende *AtML1*, welches jedoch nicht PSK-reguliert ist, ebenfalls in der Primärwurzelelongation wirkt, wurde hierfür eine T-DNA-Insertionslinie, *atml1-3* (Ogawa *et al.*, 2015) zunächst auf eine homozygote T-DNA-Insertion untersucht und die Repression der Expression des Gens verifiziert (Abbildung 33 A). Die Mutante wies keine veränderte Primärwurzellänge und Reaktion auf PSK im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 33 B). In diesem Fall könnte es also sein, dass PDF2 und *AtML1* nicht redundant agieren und PDF2 somit unabhängig von *AtML1* das Primärwurzelwachstum reguliert.

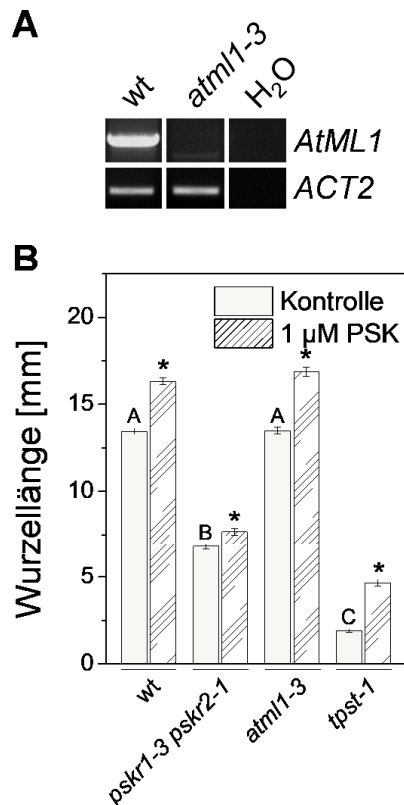


Abbildung 33: AtML1 allein reguliert nicht das Primärwurzelswachstum.

A Expressionsanalyse einer *AtML1* T-DNA-Insertionslinie (*atml1-3*).

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 62$).

Eine Doppelmutation der Gene *PDF2* und *AtML1* wurde nicht untersucht, da diese von der Embryogenese an die Etablierung der Spross epidermis unterbinden kann, dadurch die gesamte Entwicklung der Pflanze beeinträchtigt (Abe *et al.*, 2003b; Kamata *et al.*, 2013; San-Bento *et al.*, 2013; Ogawa *et al.*, 2015) und so eine differentielle Untersuchung des Wurzelwachstums kaum möglich gewesen wäre.

3.2.3.2.2 HB24 könnte eine inhibierende Wirkung auf das Primärwurzelswachstum haben

Für *HB24*, das sowohl über eine Homöodomäne als auch über ein Zinkfingermotiv verfügt (Tan & Irish, 2006), war eine hohe Transformationsrate mit dem Überexpressionsvektor zu beobachten. Im Wildtyp hintergrund waren von zwölf Linien sieben in der T₃-Generation homozygot bezüglich des verwendeten Konstruktes, im *tpst-1*-Hintergrund fünf Stück. Als T-DNA-Insertionslinie wurde *hb24-1* (diese Arbeit) ausgewählt, welche über eine Integration in der Mitte des Exons verfügt (Abbildung 31), die als homozygot verifiziert werden konnte. Die Expressionsuntersuchung über RT-PCR-Analyse war in keiner Linie trotz Anwendung unterschiedlicher PCR-Bedingungen, Primerkombinationen und Polymerasen möglich, da

kein Amplifikat erhalten werden konnte. Daher sind die Daten zu Wachstumsanalysen der verwendeten Linien unter Vorbehalt zu sehen. In der Linie *hb24-1* war eine Reduktion der Wurzellänge auf das Niveau von *pskr1-3 pskr2-1* zu beobachten (Abbildung 34). Derselbe Phänotyp mit einer verstärkten Reduktion der Wurzellänge, sogar im Vergleich zu *pskr1-3 pskr2-1*, war auch bei einer möglichen Überexpression im Wildtyphintergrund zu erkennen. Bei Transformanden des *tpst-1*-Hintergrunds war keine Veränderung der Primärwurzellänge zu beobachten. Alle beschriebenen Linien zeigten keine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Wachstumsantwort auf PSK. Ein Zusammenhang mit dem Signalweg, der zu einer PSK-vermittelten Wurzelelongation führt, ist aus diesen Daten nicht erkennbar.

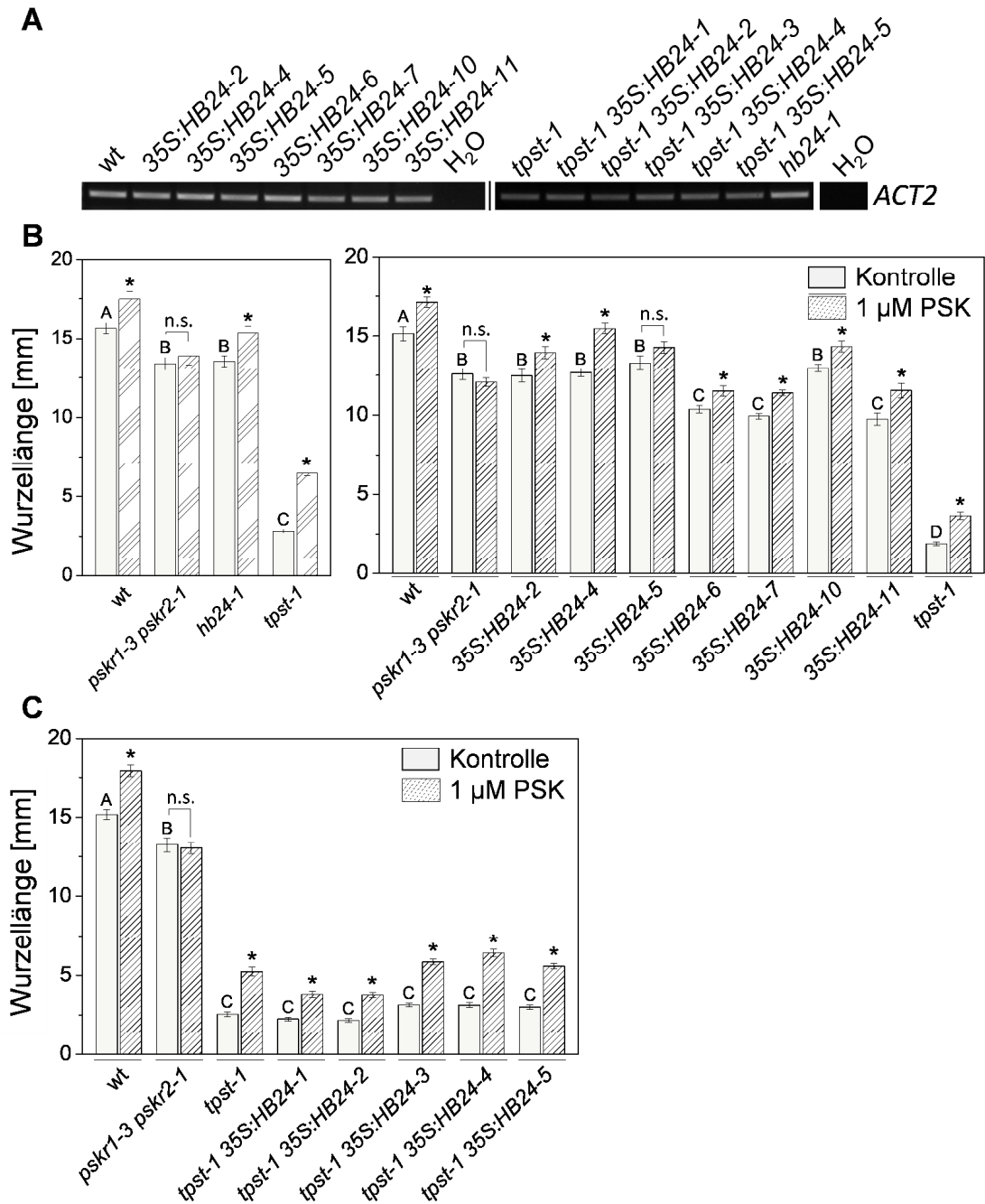


Abbildung 34: HB24 könnte das Wurzelwachstum regulieren.

A Expressionsanalyse einer *HB24* T-DNA-Insertionslinie (*hb24-1*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund nicht möglich. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B und **C** Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$).

B Phänotyp möglicher *knockout*-Linie und von Überexpressionslinien im Wildtyphintergrund (2 unabhängige Experimente für T-DNA-Insertion, $n \geq 42$; 2 unabhängige Experimente für Überexpressionslinien, $n \geq 40$).

C Phänotyp möglicher Überexpressionslinien im *tpst-1*-Hintergrund (2 unabhängige Experimente, $n \geq 40$).

3.2.3.3 Transkriptionsfaktoren mit Zinkfingermotiv - STZ, GAZ, DOF1.2, WRKY48 und HB24

Zu der Großgruppe der TFs mit Zinkfingermotiven gehören vier durch PSK reprimierte Gene, *DOF1.2* (At1g21340), *STZ* (*SALT TOLERANCE ZINC FINGER/ZINC FINGER OF Arabidopsis thaliana 10*, *ZAT10*, At1g27730), *GAZ* (At2g18490), und *WRKY48* (*WRKY DNA-BINDING PROTEIN 48*, At4g49520) sowie das soeben beschriebene *HB24* (Abbildung 35; siehe Anhang Seite 192 ff.). Diese gehören aufgrund ihrer Varianz der Zinkfinger- und zusätzlicher Domänen unterschiedlichen Untergruppen an. *DOF1.2* wurde bisher nicht beschrieben. Es ist sowohl im Spross als auch in der Wurzel schwach exprimiert (eFP Browser) (Winter *et al.*, 2007). Eine verstärkte Genaktivität ist im Bereich der Wurzelhaube vorhanden (eFP Browser, AtGenExpress Visualization Tool) (Kilian *et al.*, 2007; Goda *et al.*, 2008). Bei *STZ* handelt es sich um ein calciumresponsives Protein (Bai *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2018). Sowohl bei einer Überexpression als auch bei einem Verlust des Gens kommt es zu einem verstärkten Wachstum der Rosettenblätter durch Zellexpansion (Sakamoto *et al.*, 2004; Rossel *et al.*, 2007; Munekage *et al.*, 2015). Beide Beobachtungen könnten ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion mit dem PSK-Signalweg sein. *GAZ* reguliert die Bildung des mittleren Kortex in der Primärwurzel (Lee *et al.*, 2016) und somit genauso wie PSK die Entwicklung dieses Organs. *WRKY48* wird durch bakterielle Pathogene induziert (Qutob *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2008), durch calciumabhängige Proteinkinasen reguliert (Gao *et al.*, 2013; Gao & He, 2013) und wirkt sich negativ auf das Rosettenwachstum aus (Xing *et al.*, 2008). Auch hier wäre eine Verknüpfung mit dem PSK-Signalweg naheliegend. Eine Beschreibung der Ergebnisse der Untersuchungen für *HB24* ist dem vorigen Kapitel zu entnehmen.

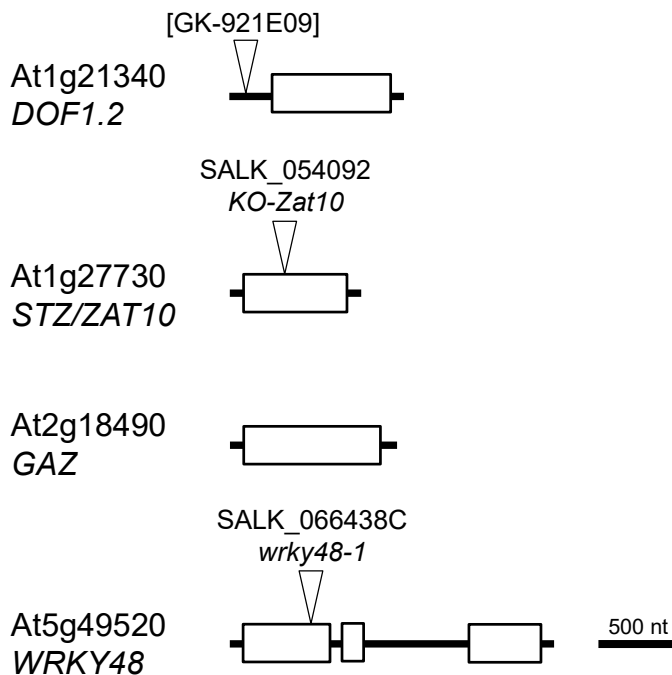


Abbildung 35: Exon-Intron-Struktur der Zinkfingertranskriptionsfaktorgene *DOF1.2*, *STZ*, *GAZ* und *WRKY48*.

Weißer Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Die T-DNA-Insertionen der Linien GK-921E09, *KO-Zat10* und *wrky48-1* sind als Dreiecke dargestellt. Eckige Klammern weisen darauf hin, dass die T-DNA-Insertion zu keiner Expressionsreduktion führt.

3.2.3.3.1 *DOF1.2* beeinflusst nicht das Primärwurzelwachstum

Sieben von zehn Überexpressionslinien für *DOF1.2* zeigten in der T_3 -Generation eine Vererbung des Überexpressionskonstrukts und eine verstärkte Expression konnte bestätigt werden (Abbildung 36 A). Dies wurde für drei von sieben unabhängigen Linien im *tpst-1*-Hintergrund ebenfalls verifiziert. Für *DOF1.2* wurden bisher keine T-DNA-Insertionslinien beschrieben. Einzig verfügbar war eine Linie mit einer Integration etwa 150 bp vor dem Startcodon. Diese wurde auf eine mögliche Repression der *DOF1.2*-Expression untersucht, die nicht bestätigt werden konnte (vgl. Abbildung 35, Abbildung 36 A).

Eine Untersuchung der Überexpressionslinien im Wildtyphintergrund zeigte keine Veränderung der Primärwurzellänge und eine mit dem Wildtyp vergleichbare Wachstumsreaktion auf PSK (Abbildung 36). Auch Überexpressionslinien im *tpst-1*-Hintergrund zeigten keinen veränderten Phänotyp und keine veränderte PSK-Antwort. Auffällig war jedoch, dass die untersuchten Linien überwiegend eine sehr schlechte Keimungsrate aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Eine Funktion von *DOF1.2* im Primärwurzelwachstum und eine Interaktion mit dem PSK-Signalweg waren somit nicht nachweisbar.

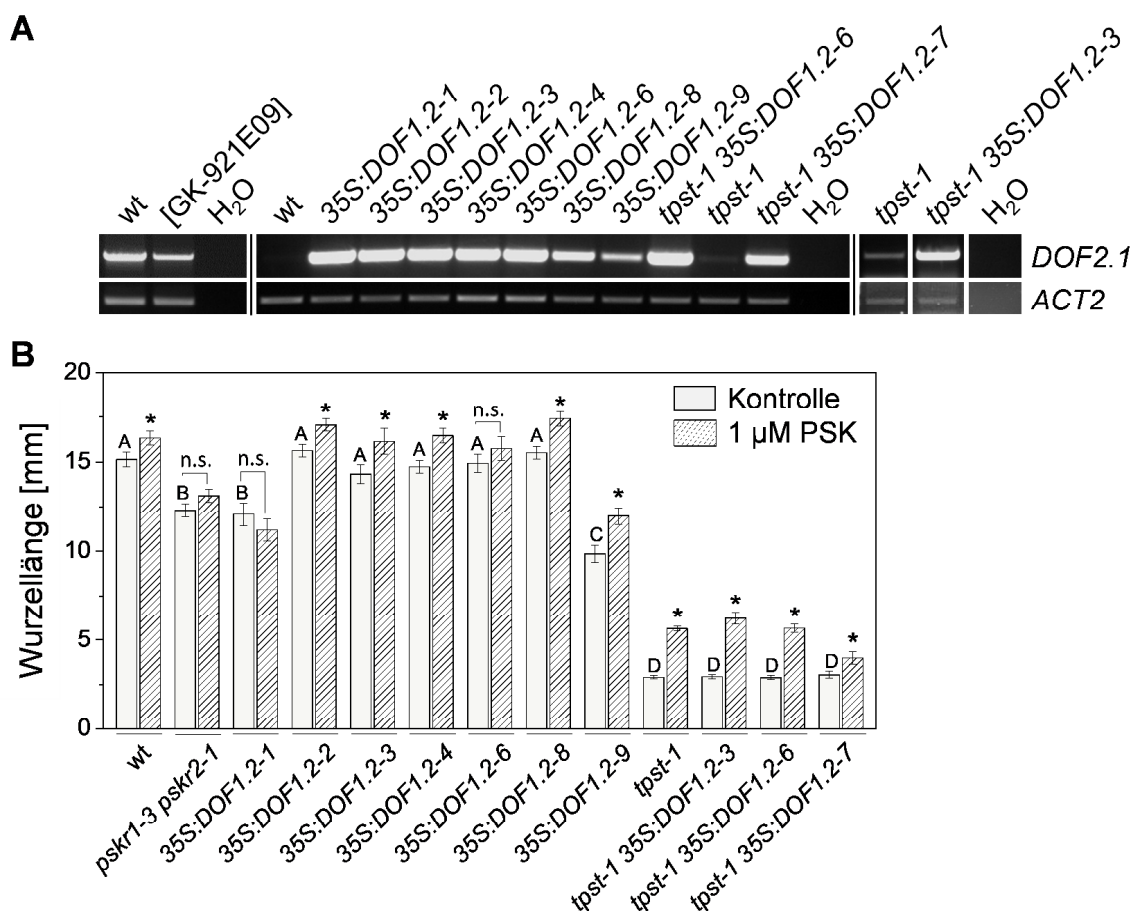


Abbildung 36: DOF1.2 reguliert nicht die Primärwurzelelongation.

A Expressionsanalyse einer *DOF1.2* T-DNA-Insertionslinie (GK-921E09) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Eckige Klammern weisen darauf hin, dass die T-DNA-Insertion zu keiner Expressionsreduktion führt.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 2 unabhängige Experimente, $n \geq 23$).

3.2.3.3.2 STZ reguliert das Primärwurzelwachstum nicht

Eine Generierung von Überexpressionslinien für das TF-Gen *STZ* im Wildtyphintergrund war trotz mehrmaliger Transformationsversuche nicht erfolgreich. Dies deckte sich mit den Beschreibungen von Sakamoto *et al.* (2004), die ebenfalls eine auffallend schlechte Transformationsrate erwähnten und bei positiven Transformanden nur in wenigen Fällen eine Überexpression nachweisen konnten. Im *tpst-1*-Hintergrund wurden drei Transformanden generiert, die in der T₃-Generation homozygot für das verwendete Konstrukt waren und eine Überexpression von *STZ* zeigten (Abbildung 37 A). Als *STZ*-reprimierende Linie wurde *KO-Zat10* (Mittler *et al.*, 2006) mit einer T-DNA-Insertion vor der Mitte des Exons ausgewählt (Abbildung 35) und eine Transkriptreduktion in homozygoten Pflanzen bestätigt (Abbildung 37 A).

Unter Kontrollbedingungen und in Antwort auf PSK war kein verändertes Wachstum der Wurzel von *KO-Zat10* im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Dies deckte sich mit den Beobachtungen von Mittler *et al.* (2006), die ebenfalls keine Veränderung des Phänotyps bei einem Verlust des Gens beobachten konnten. Eine Überexpression von *STZ* im *tpst-1*-Hintergrund bewirkte keine statistisch signifikante Veränderung der Wurzellänge und ein verstärktes Wachstum in Antwort auf PSK. Aus diesen Gründen wurde darauf geschlossen, dass *STZ* nicht das Primärwurzelswachstum reguliert.

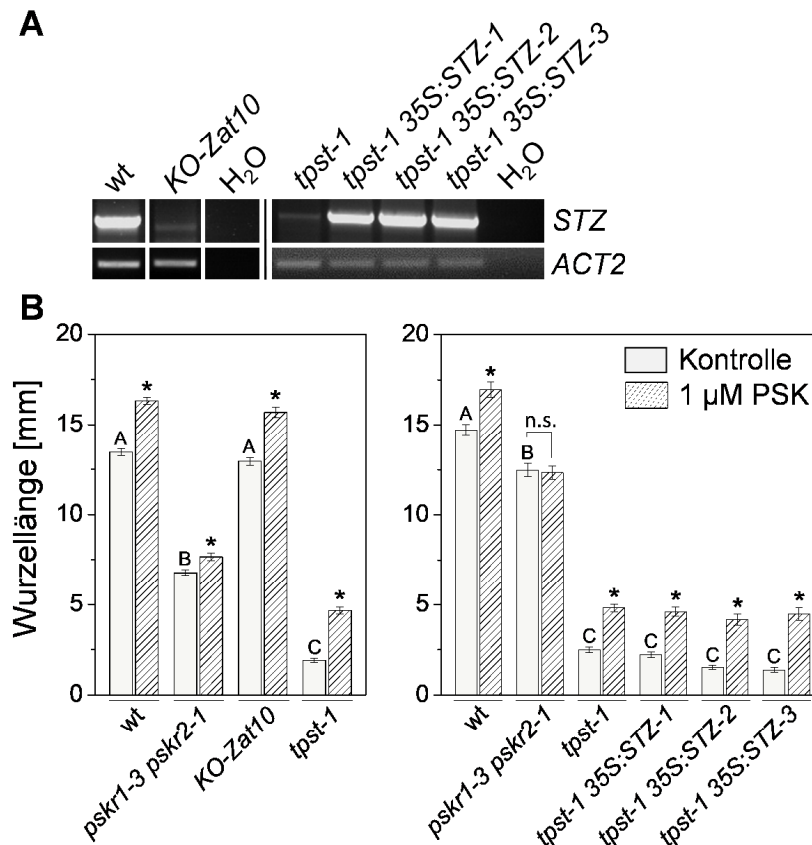


Abbildung 37: STZ reguliert nicht das Wurzelwachstum.

A Expressionsanalyse einer *STZ/ZAT10* T-DNA-Insertionslinie (*KO-Zat10*) und von Überexpressionslinien im *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente für T-DNA-Insertion, $n \geq 62$; 2 unabhängige Experimente für Überexpressionslinien, $n \geq 30$).

3.2.3.3.3 GAZ reguliert nicht das Primärwurzelswachstum

Zunächst wurden Überexpressionslinien für *GAZ* im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund hergestellt, die jedoch verworfen wurden, da Lee *et al.* (2016) das Gen/Protein neu annotierten und die bisher bekannte Sequenz um 50 Aminosäuren am N-Terminus erweitert wurde. Aus diesem Grund wurden die von Lee *et al.* (2016) hergestellten

Überexpressionslinien *GAZ-OX #4*, *#5* und *#10*, sowie die Linie *GAZ-SRDX* verwendet. Letztere enthält eine an das *GAZ*-Gen gekoppelte reprimierende Sequenz (Hiratsu *et al.*, 2003; Hiratsua *et al.*, 2004) und dient als Alternative zu einer T-DNA-Insertionslinie. Diese Linien wurden bezüglich ihrer Wachstumsantwort auf PSK untersucht. Die Primärwurzellänge und die Wachstumsreaktion der *GAZ*-überexprimierenden und -reprimierenden Linien in Antwort auf PSK unterschieden sich nicht vom Wildtyp (Abbildung 38). Auch Lee *et al.* (2016) konnten keinen signifikanten Unterschied in der Wurzellänge der Linien unter Kontrollbedingungen im Vergleich zum Wildtyp nachweisen. Daher wurde angenommen, dass *GAZ* nicht das Primärwurzelwachstum reguliert.

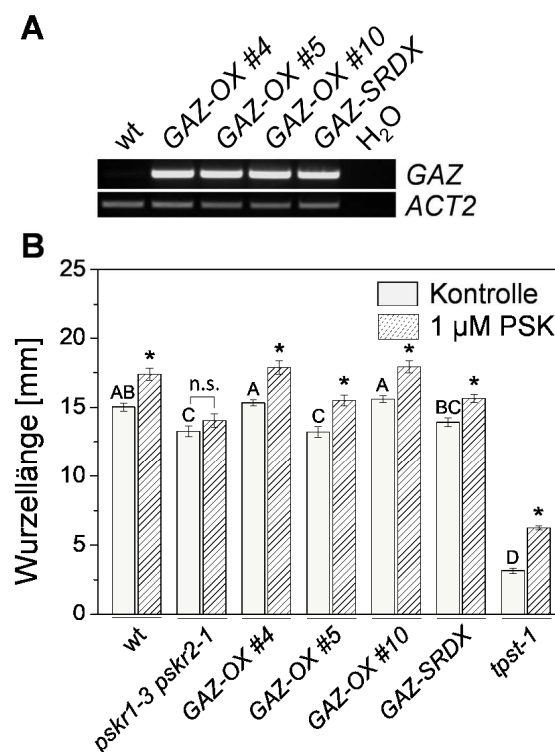


Abbildung 38: GAZ reguliert nicht das Wurzelwachstum.

A Expressionsanalyse einer *GAZ*-reprimierenden Linie (*GAZ-SRDX*) und von Überexpressionslinien im Wildtyphintergrund.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asterisken zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 2 unabhängige Experimente, $n \geq 41$).

3.2.3.3.4 WRKY48 reguliert das Primärwurzelwachstum

Zur Untersuchung von *WRKY48* wurden acht Transformanten im Wildtyphintergrund generiert, von denen vier homozygot bezüglich einer *BASTA*[®]-Resistenz waren. Im *tpst-1*-Hintergrund wurde eine Linie identifiziert, die jedoch in der T_3 -Generation nicht homozygot für das Überexpressionskonstrukt war. Diese Linien wurden bisher nicht analysiert. Die homozygote T-DNA-Insertionslinie *wrky48-1* (Xing *et al.*, 2008), mit einer Integration im hinteren Bereich des ersten Exons (Abbildung 35), wies eine reduzierte Transkriptmenge auf

(Abbildung 39 A). *wrky48-1*-Keimlinge hatten eine kürzere Primärwurzel (Abbildung 39 B). Eine Veränderung der Wachstumsreaktion auf PSK im Vergleich zum Wildtyp war jedoch nicht vorhanden. Diese Ergebnisse gaben keinen Hinweis darauf, dass WRKY48 das PSK-abhängige Primärwurzelwachstum reguliert.

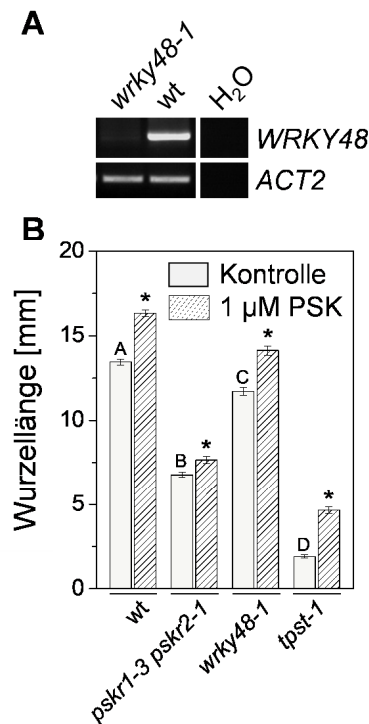


Abbildung 39: WRKY48 fördert das Primärwurzelwachstum.

A Expressionsanalyse einer *WRKY48* T-DNA-Insertionslinie (*wrky48-1*).

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 22$).

3.2.3.4 Die NAC-Domänentranskriptionsfaktoren NAC015, NAC031 und NAC068

Von der Familie der NAC-TFs wird die Expression dreier Gene durch PSK reprimiert. Es handelt sich um *NAC015* (At1g33280), *NAC031* (At1g76420) und *NAC068* (*NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 68*, *NAC068/NAC WITH TRANSMEMBRANE MOTIF 1*, *NTM1*; At4g01540) (Abbildung 40; siehe Anhang Seite 195 ff.). *NAC015* reguliert zusammen mit *NAC070* (*NAC-DOMAIN CONTAINING PROTEIN 70/BEARSKIN 2*, *BRN2*) und *SMB* (*SOMBRERO*) die Separierung der Wurzelhaubenzellschichten während des Wachstums durch eine Regulation des Polygalakturonasegens *RCPG* (*ROOT CAP POLYGALACTURONASE*; At1g65570) (Komori *et al.*, 2009; Kamiya *et al.*, 2016). Die Expression von *RCPG* wird durch PSK und andere sulfatierte Peptide reguliert (Anhang Tabelle 17, Seite 182). Dies ist ein Hinweis darauf, dass *NAC015* im PSK-Signalweg agieren könnte. *NAC031* bewirkt durch eine Reduktion des Wachstums an definierten Stellen des Kormus die Formung von

Organgrenzen (Vroemen *et al.*, 2003; Hibara *et al.*, 2006; Balkunde *et al.*, 2017). Der PSK-Signalweg könnte entgegen dieser Wachstumsrepression agieren. NAC068, ein membrangebundener TF, induziert cyclinabhängige Kinaseinhibitorgene, die zu einer Reduktion der Zellteilungsaktivität beitragen (Kim *et al.*, 2006). Der PSK-Signalweg könnte die durch NAC068 inhibierte Zellteilung stimulieren.

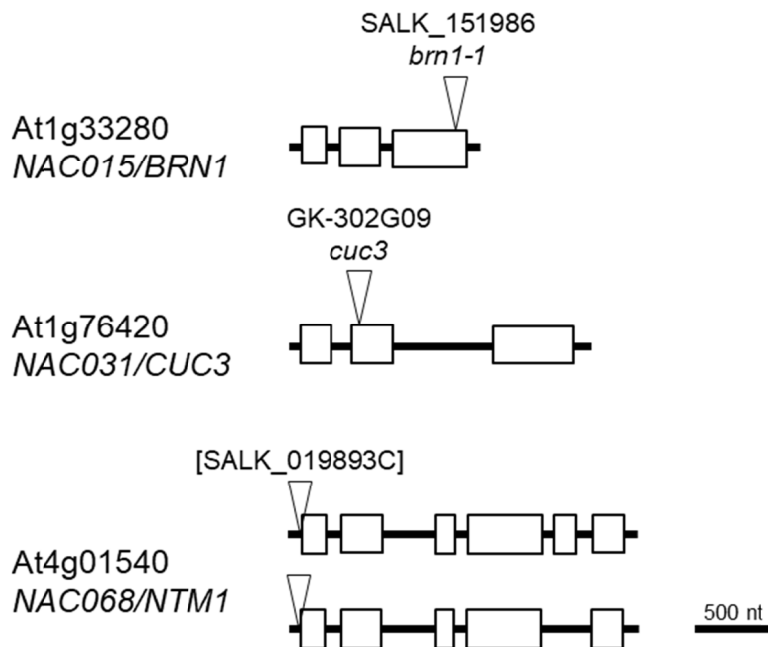


Abbildung 40: Exon-Intron-Struktur der NAC-Transkriptionsfaktorgene *NAC015*, *NAC031* und *NAC068*.

Weiße Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Für *NAC068* sind zwei Spleißformen beschrieben. Die T-DNA-Insertionen der Linien *brn1-1*, *cuc3* und SALK_019893C sind als Dreiecke dargestellt. Eckige Klammern weisen darauf hin, dass die T-DNA-Insertion zu keiner Expressionsreduktion führt.

3.2.3.4.1 *NAC015* reguliert nicht das Primärwurzelswachstum

Bei der Herstellung von Überexpressionslinien für *NAC015* wurde eine geringe Transformationsrate erzielt. Von vier Transformanden, die im Wildtyphintergrund generiert wurden, waren in der T₄-Generation drei homozygot für das Konstrukt. Im *tpst-1*-Hintergrund wurden ebenfalls vier Transformanden generierte, von denen jedoch nur eine Linie in der T₅-Generation homozygot für eine BASTA®-Resistenz war. Für diese Linien wurde eine Überexpression von *NAC015* bestätigt (Abbildung 41 A). Für die homozygote T-DNA-Insertionslinie *brn1-1* (Bennett *et al.*, 2010), mit einer Insertion am Ende des letzten Exons (Abbildung 40), wurde ein *knockout* bestätigt (Abbildung 41 A).

Bei einer Überexpression von *NAC015* im Wildtyphintergrund war keine Veränderung der Wurzellänge sichtbar, ebenso war eine unveränderte Wachstumsreaktion auf PSK zu beobachten (Abbildung 41 B). Auch das Wachstum der Wurzel von *brn1-1* war mit dem des Wildtyps vergleichbar. Dies deckte sich mit den Ausführungen von Bennett *et al.* (2010), die beschrieben, dass ein *knockout* von *BRN1* keine Veränderung des Wachstums

der Pflanze bewirkt. Im *tpst-1*-Hintergrund rief eine Überexpression des Gens ebenfalls keine Veränderung der Wurzellänge im Vergleich zum Hintergrund hervor. In Antwort auf PSK war eine Elongation der Wurzel zu erkennen. Aufgrund dieser Daten konnte eine Einbindung von NAC015 in den Prozess des Wurzelwachstums nicht bestätigt werden.

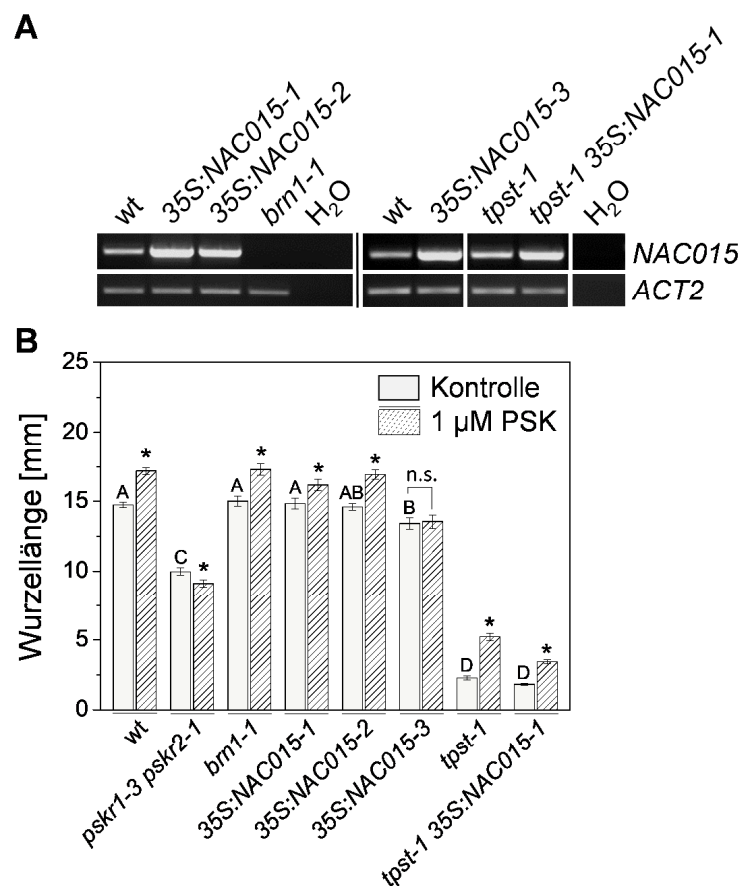


Abbildung 41: NAC015 reguliert nicht das Primärwurzelwachstum.

A Expressionsanalyse einer *NAC015* T-DNA-Insertionslinie (*brn1-1*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 2 unabhängige Experimente, $n \geq 45$).

3.2.3.4.2 Sowohl eine Überexpression als auch eine Repression von *NAC031* verstärken das Primärwurzelwachstum

Im Wildtyphintergrund wurden acht Transformanden zur Überexpression von *NAC031* hergestellt, von denen vier die verwendete BASTA[®]-Resistenz in der T₃-Generation homozygot in sich trugen. Im *tpst-1*-Hintergrund wurden ebenfalls acht Transformanden generiert, von denen jedoch nur zwei in der T₄-Generation homozygot für das Überexpressionskonstrukt waren. Die Überexpressionslinien wurden positiv auf eine verstärkte Genaktivität getestet (Abbildung 42 A). Zudem wurde für die T-DNA-

Insertionslinie *cuc3-105* (Hibara *et al.*, 2006), mit einer Integration am Anfang des zweiten Exons (Abbildung 40), die Abwesenheit des *NAC031*-Transkripts bestätigt (Abbildung 42 A).

Eine Überexpression von *NAC031* bewirkte in zwei von vier Linien eine statistisch signifikante Verlängerung der Primärwurzel im Vergleich zum Wildtyp unter Kontrollbedingungen (Abbildung 42 B), wirkte sich jedoch nicht auf die PSK-Wachstumsantwort der Pflanze aus. In der Linie *cuc3-105* zeigte sich die Wurzel ebenfalls verlängert, jedoch war auch hier keine veränderte Reaktion auf PSK im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Im *tpst-1*-Hintergrund war weder ein verändertes Wachstum der Wurzel noch eine Veränderung der Reaktion auf PSK zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *NAC031* in ein Signalnetzwerk eingebunden ist, in dem Abweichungen der *NAC031*-Expression zu einem verstärkten Wurzelwachstum führen.

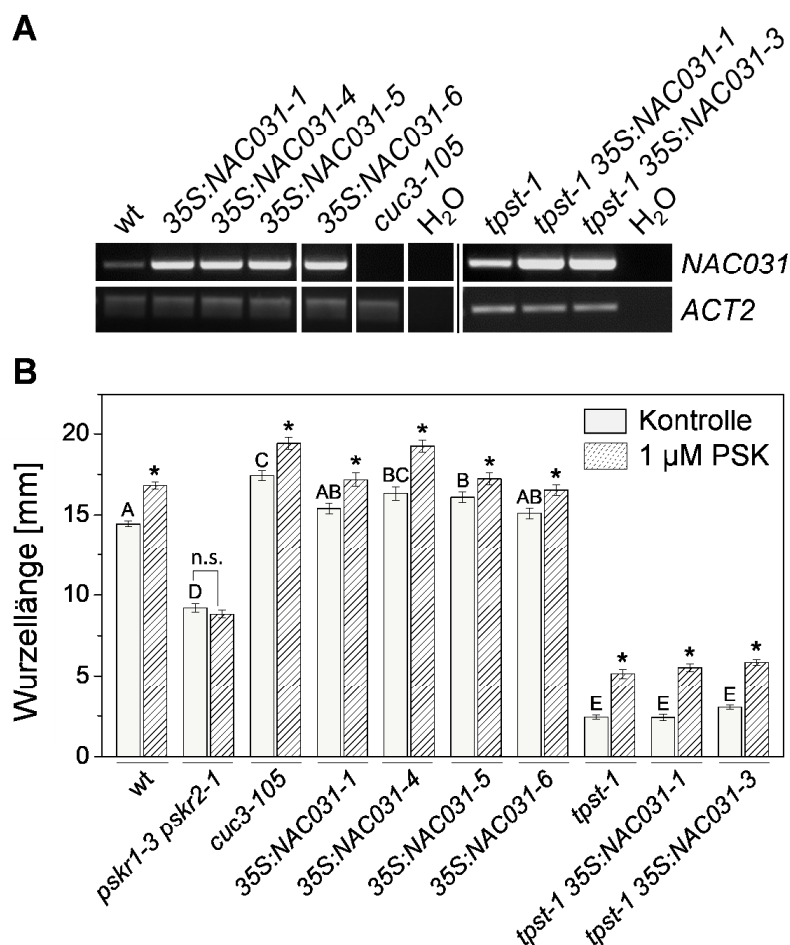


Abbildung 42: Veränderungen der *NAC031*-Expressionsstärke induzieren das Primärwurzelwachstum.

A Expressionsanalyse einer *NAC031* T-DNA-Insertionslinie (*cuc3-105*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 2 unabhängige Experimente, $n \geq 47$).

3.2.3.4.3 Eine Überexpression von *NAC068* beeinflusst nicht das Primärwurzelswachstum

Für *NAC068* sind zwei Spleißformen beschrieben (Abbildung 40). Für die hier durchgeführten Analysen wurde die erste, mit sechs Exons ausgewählt. Bei einer Transformation mit einem *NAC068*-Überexpressionsvektor wurde eine hohe Transformationsrate erzielt. Von zwölf Transformanden wurden sechs weiter auf eine homozygote BASTA®-Resistenz in der T₃-Generation untersucht, die vier der Linien aufwiesen. Diese zeigten eine Überexpression von *NAC068* (Abbildung 43 A). Im *tpst-1*-Hintergrund wurden acht Transformanden erhalten, von denen zwei das Konstrukt homozygot trugen und ausreichend Saatgut produzierten um weitere Versuche durchführen zu können. Auch diese zeigten eine verstärkte Expression des Gens (Abbildung 43 A). Die T-DNA-Insertionslinie SALK_019893C (Abbildung 40), mit einer Integration im 5'-UTR 80 Basen vor dem Startcodon, erwies sich nicht als *knockout*-Linie und wurde aus diesem Grund nicht weiter untersucht (Abbildung 43 A).

Eine Überexpression von *NAC068* wirkte sich nicht auf das Wachstum der Primärwurzel und die Wachstumsreaktion in Antwort auf PSK im Wildtyphintergrund aus (Abbildung 43 B). In einigen Fällen war keine Reaktion auf PSK-Zugabe zu beobachten, was jedoch möglicherweise auf eine reduzierte Reaktion aller untersuchten Pflanzen in diesen Versuchen, inklusive des Wildtyps und der *tpst-1*, zurückzuführen ist. Eine Überexpression im *tpst-1*-Hintergrund bewirkte keine statistisch signifikante Veränderung des Wachstums der Primärwurzel. Dass eine Überexpression von *NAC068* keine Veränderung des Wurzelwachstums hervorrief, könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Genprodukt membrangebunden und dadurch inaktiv ist. Der TF wird durch einen proteolytischen Spaltungsprozess aktiviert (Kim *et al.*, 2006; Kim & Park, 2007). Eine Linie, die die aktive Form von *NAC068* überexprimiert, wurde von Kim *et al.* (2006) nicht zur Verfügung gestellt. Da im Wildtyp kein statistisch signifikanter Zuwachs der Wurzellänge in Antwort auf PSK nachzuweisen war, lässt sich für *NAC068* keine Aussage bezüglich einer Regulation des Wurzelwachstums in Antwort auf PSK treffen.

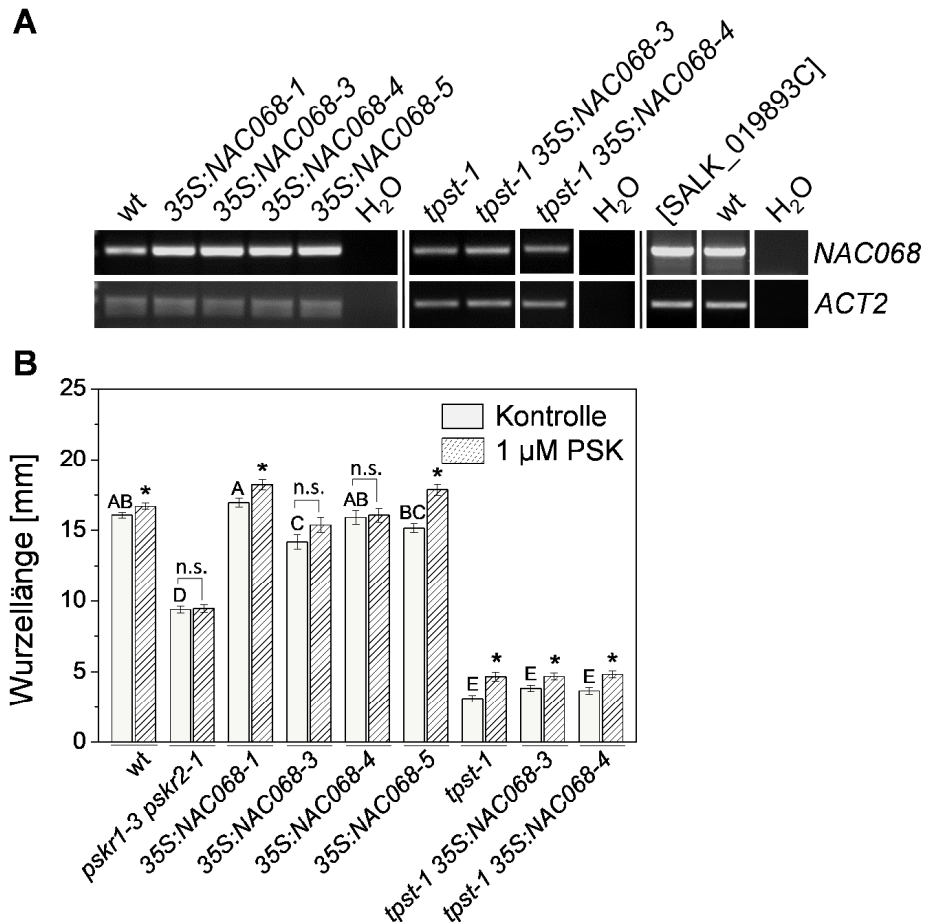


Abbildung 43: NAC068 reguliert nicht das Primärwurzelwachstum.

A Expressionsanalyse einer *NAC068* T-DNA-Insertionslinie (SALK_019893C) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Eckige Klammern weisen darauf hin, dass die T-DNA-Insertion zu keiner Expressionsreduktion führt.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (*t*-Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 56$).

3.2.3.5 Die AP2/EREBP-Transkriptionsfaktoren RAP2.3, ESE3 und ERF104

Die Familie der AP2/EREBP-TFs beinhaltet drei Gene, die durch PSK reprimiert werden: *RAP2.3* (*RELATED TO AP2 3/ETHYLENE RESPONSE FACTOR 72*, *ERF72/ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN*, *EBP*; At3g6770), *ESE3* (At5g25190) und *ERF104* (At5g61600) (Abbildung 44; siehe Anhang Seite 197 ff.). *RAP2.3* wirkt in den Signalwegen verschiedener Phytohormone und in multiplen Stressantworten, unter anderem der Pathogenantwort (Büttner & Singh, 1997; Brenner *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2005; Govrin *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014; Marín-de la Rosa *et al.*, 2014; Deslauriers *et al.*, 2015; Papdi *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2017). Auch für PSK ist die Einbindung in die Pathogenantwort beschrieben. *ESE3* und *ERF104* wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

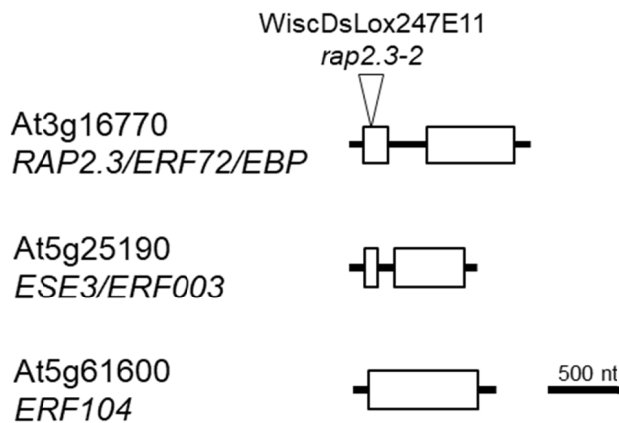


Abbildung 44: Exon-Intron-Struktur der AP2/EREBP-Transkriptionsfaktorgene *RAP2.3*, *ESE3* und *ERF104*.

Weißer Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Die T-DNA-Insertion der Linie *rap2.3-2* ist als Dreieck dargestellt.

3.2.3.5.1 RAP2.3 reprimiert das Primärwurzelwachstums

Zur Untersuchung von RAP2.3 in Verbindung mit dem PSK-Signalweg wurden drei Überexpressionslinien im Wildtypintergrund (zur Verfügung gestellt von Eysholdt-Derzsó, E., AG Sauter) und die *knockout*-Linie *rap2.3-2* (Marín-de la Rosa *et al.*, 2014), mit einer Integration am Anfang des ersten Exons (Abbildung 44), genutzt. Für die Überexpressionslinien war keine starke Steigerung der Transkriptmenge nachgewiesen worden (Eysholdt-Derzsó, E., AG Sauter; Abbildung 45 A). Ein Fehlen des *RAP2.3*-Transkriptes in der *rap2.3-2* war bestätigt worden (Lin, C., AG Sauter; Abbildung 45 A). Zusätzlich wurde die Mehrfach-*knockout*-Linie *erfVII* genutzt, in der alle fünf Mitglieder der ERFVII-Gruppe, zu der *RAP2.3* gehört, ausgeschaltet sind (Abbas *et al.* (2015), zur Verfügung gestellt von Eysholdt-Derzsó, E., AG Sauter).

Die Einzel- und Mehrfach-*knockout*-Linien wiesen keine Veränderungen der Primärwurzellänge im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 45 B). Auch in Antwort auf PSK waren keine eindeutigen Unterschiede zum Wildtyp zu erkennen. Bei einer Überexpression war jedoch eine Reduktion der Primärwurzellänge zu beobachten, die bisher nicht beschrieben wurde (Papdi *et al.*, 2015). Eine veränderte Wachstumsreaktion in Antwort auf PSK war jedoch nicht vorhanden. RAP2.3 reguliert somit das Primärwurzelwachstum, beeinflusst jedoch nicht die PSK-vermittelte Wurzelelongation.

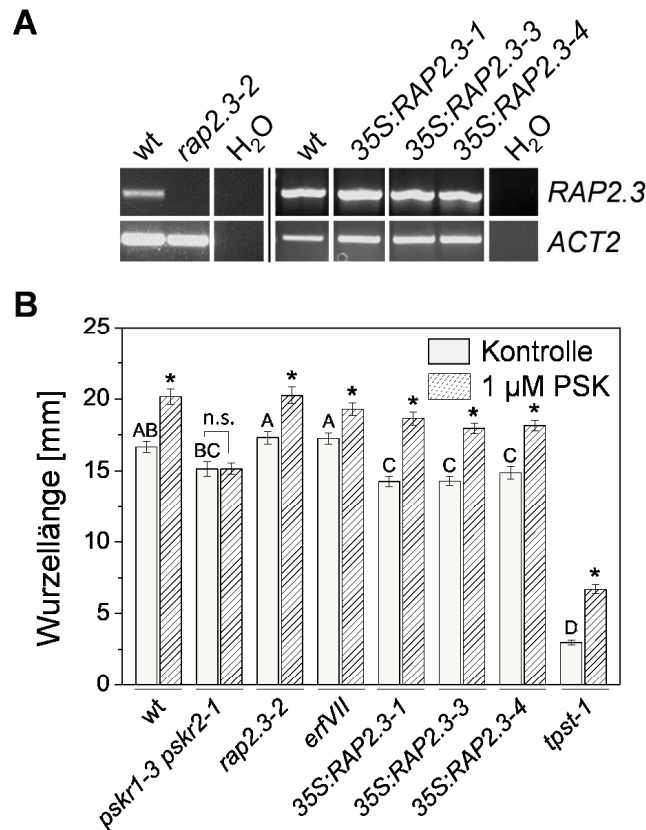


Abbildung 45: RAP2.3 reprimiert die Primärwurzelelongation.

A Expressionsanalyse einer *RAP2.3* T-DNA-Insertionslinie (*rap2.3-2*), durchgeführt von Lin, C. (AG Sauter), und von Überexpressionslinien im Wildtypintergrund, durchgeführt von Eysholdt-Derzsó, E. (AG Sauter). Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (*t*-Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 66$).

3.2.3.6 Der MYB-Domänentranskriptionsfaktor MYB88 reguliert nicht die PSK-abhängige Primärwurzelelongation

Das MYB-Domänengen *MYB88* (At2g02820, Abbildung 46) wird durch PSK in seiner Expression induziert. Zusätzlich zu einer Regulation der Stomaentwicklung (Lai *et al.*, 2005; Ohashi-Ito & Bergmann, 2006), in der durch den TF die Expression von Zellzyklusgenen beeinflusst wird (Vanneste *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014), wirkt er in der Zellelongation des Hypokotyls (Xu *et al.*, 2017) und reguliert die Entwicklung der Wurzel in Antwort auf Schwerkraft (Chen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015a) (siehe Anhang Seite 200 ff.). Die letzteren Entdeckungen könnten ein Hinweis auf eine Interaktion von *MYB88* mit dem PSK-Signalweg sein. Für *MYB88* sind zwei Spleißformen bekannt (Abbildung 46). Für die hier durchgeführten Analysen wurde die erste, mit elf Exons ausgewählt.

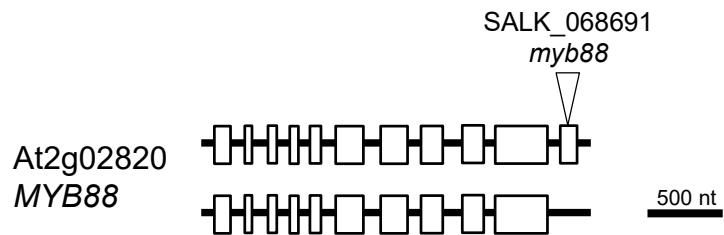


Abbildung 46: Exon-Intron-Struktur des MYB-Domänen-Transkriptionsfaktorgens *MYB88*.

Weißer Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Für *MYB88* sind zwei Spleißformen beschrieben. Die T-DNA-Insertion der Linie *myb88* ist als Dreieck dargestellt.

Für eine Überexpression von *MYB88* im Wildtyp-Hintergrund konnten 15 Transformanten generiert werden. Sechs davon wurden auf eine homozygote Insertion des Überexpressionskonstrukts untersucht, die drei der Linien aufwies. Diese zeigten jedoch nur eine schwache Überexpression (Abbildung 47 A). Im *tpst-1*-Hintergrund wurden lediglich vier Transformanten erhalten, deren Saatgut jedoch in der T₅-Generation weiterhin eine Aufspaltung bezüglich der BASTA®-Resistenz aufwies. Mit diesen Pflanzen wurde nicht weiter gearbeitet. Für *MYB88* existiert eine T-DNA-Insertionslinie, *myb88* (Lai *et al.*, 2005), bei der sich die Insertion im letzten Exon des Gens befindet (Abbildung 46), welches in einer alternativen Splicingform nicht berücksichtigt wird. Es ist also möglich, dass in der T-DNA-Insertionslinie ein zumindest teilweise aktives Genprodukt vorhanden ist. Die Repression des *MYB88*-Transkripts konnte für *myb88* bestätigt werden (Abbildung 47 A).

Die Primärwurzel war bei einer Induktion der Expression von *MYB88* länger als die des Wildtyps unter Kontrollbedingungen (Abbildung 47 B). *myb88* zeigte keine Veränderung der Wurzellänge (Abbildung 47 B). Durch Lai *et al.* (2005) und Xie *et al.* (2010b) wurde bereits beschrieben, dass ein Einzel-*knockout* von *MYB88* keine eindeutig sichtbaren Veränderungen in der Morphogenese des Kormus unter Kontrollbedingungen hervorruft. Eine veränderte Wachstumsreaktion in Antwort auf PSK war in keiner der untersuchten Linien sichtbar. Unter Berücksichtigung der genannten Daten lässt sich sagen, dass *MYB88* das Primärwurzelwachstum unterstützt, eine Regulation der PSK-abhängigen Wurzelelongation durch den TF jedoch unwahrscheinlich ist.

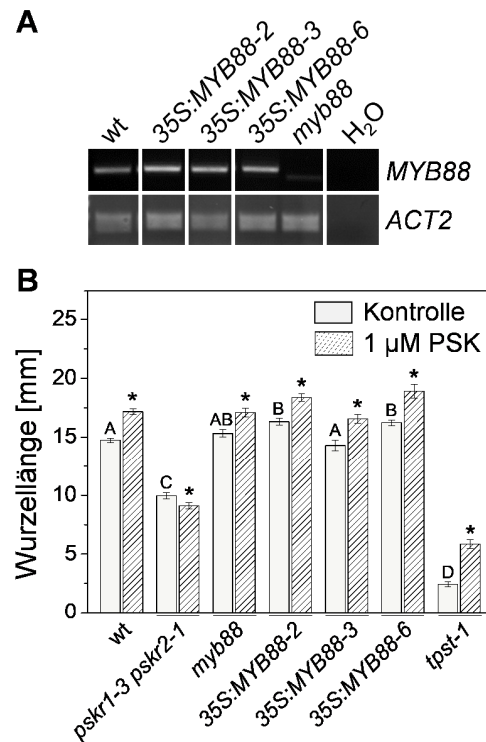


Abbildung 47: MYB88-Aktivität trägt zum Wurzelwachstum bei.

A Expressionsanalyse einer *MYB88* T-DNA-Insertionslinie (*myb88*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp-Hintergrund.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige, $n \geq 39$).

3.2.3.7 Der bHLH-Transkriptionsfaktor bHLH129 interagiert mit dem PSK-Signalweg

Für das durch PSK reprimierte bHLH-TF-Gen *bHLH129* (At2g43140; Abbildung 48) ist eine wachstumsinduzierende Wirkung für die Primärwurzel beschrieben, bei einer gleichzeitigen Reduktion der Sensitivität gegenüber ABA (Tian *et al.*, 2015) (siehe Anhang Seite 201 ff.). Es ist besonders stark in der Wurzel und den Kotyledonen exprimiert (Tian *et al.*, 2015). Dies könnte ein Hinweis auf eine Interaktion mit dem PSK-Signalweg sein. Für *bHLH129* existieren zwei Spleißformen (Abbildung 48). Für die hier durchgeführten Analysen wurde die erste, mit sechs Exons ausgewählt.

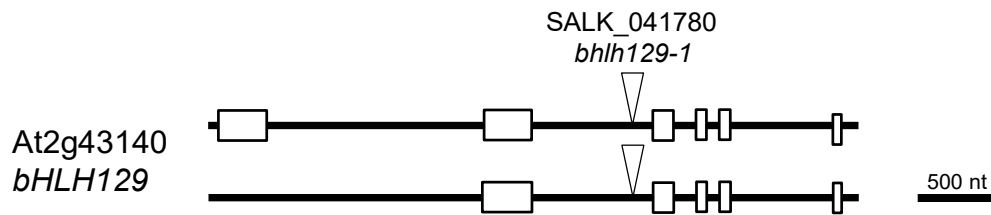


Abbildung 48: Exon-Intron-Struktur des bHLH-Transkriptionsfaktorgens *bHLH129*.

Weiße Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Für *bHLH129* sind zwei Spleißformen beschrieben. Die T-DNA-Insertion der Linie *bhlh129-1* ist als Dreieck dargestellt.

Bei der Herstellung von Überexpressionslinien für *bHLH129* im Wildtyphintergrund wurden elf Transformanten erhalten, von denen neun eine homozygote BASTA®-Resistenz und eine erhöhte Menge an *bHLH129*-Transkript aufwiesen (Abbildung 49 A). Im *tpst-1*-Hintergrund war die Transformationsrate gering. Von drei Transformanten zeigten zwei homozygote Linien eine Überexpression und wurden für weitere Analysen eingesetzt. Die T-DNA-Insertionslinie *bhlh129-1* (Tian *et al.*, 2015), mit einer Integration im zweiten beziehungsweise ersten Intron des Gens (Abbildung 48), zeigte bei einer homozygoten Insertion eine Reduktion des Transkripts (Abbildung 49 A).

Bei einer Überexpression von *bHLH129* im Wildtyphintergrund waren sowohl verlängerte als auch verkürzte Primärwurzeln unter Kontrollbedingungen im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Abbildung 49 B). Tian *et al.* (2015) wiesen für eine Überexpression ein verstärktes Wurzelwachstum aus. Die *bhlh129-1* unterschied sich, wie durch Tian *et al.* (2015) beschrieben, in Bezug auf die Wurzellänge nicht vom Wildtyp. Sowohl die Großzahl der Überexpressionslinien im Wildtyphintergrund als auch die T-DNA-Insertionslinie wiesen keine Elongation der Primärwurzel in Antwort auf PSK auf. Bei einer Überexpression im *tpst-1*-Hintergrund war die Primärwurzellänge nicht statistisch signifikant verändert und zeigte eine schwach reduzierte Wachstumsantwort auf PSK. Eine Aussage über die Regulation des Wurzelwachstums durch bHLH129 ist wegen der Varianz der Wurzellängen der Überexpressionslinien schwierig zu treffen. Die fehlende Wachstumsreaktion auf PSK sowohl bei einer Überexpression als auch bei einem *knockout* lässt die Vermutung zu, dass bHLH129 in einem Feedbackmechanismus in der PSK-vermittelten Primärwurzelelongation wirkt.

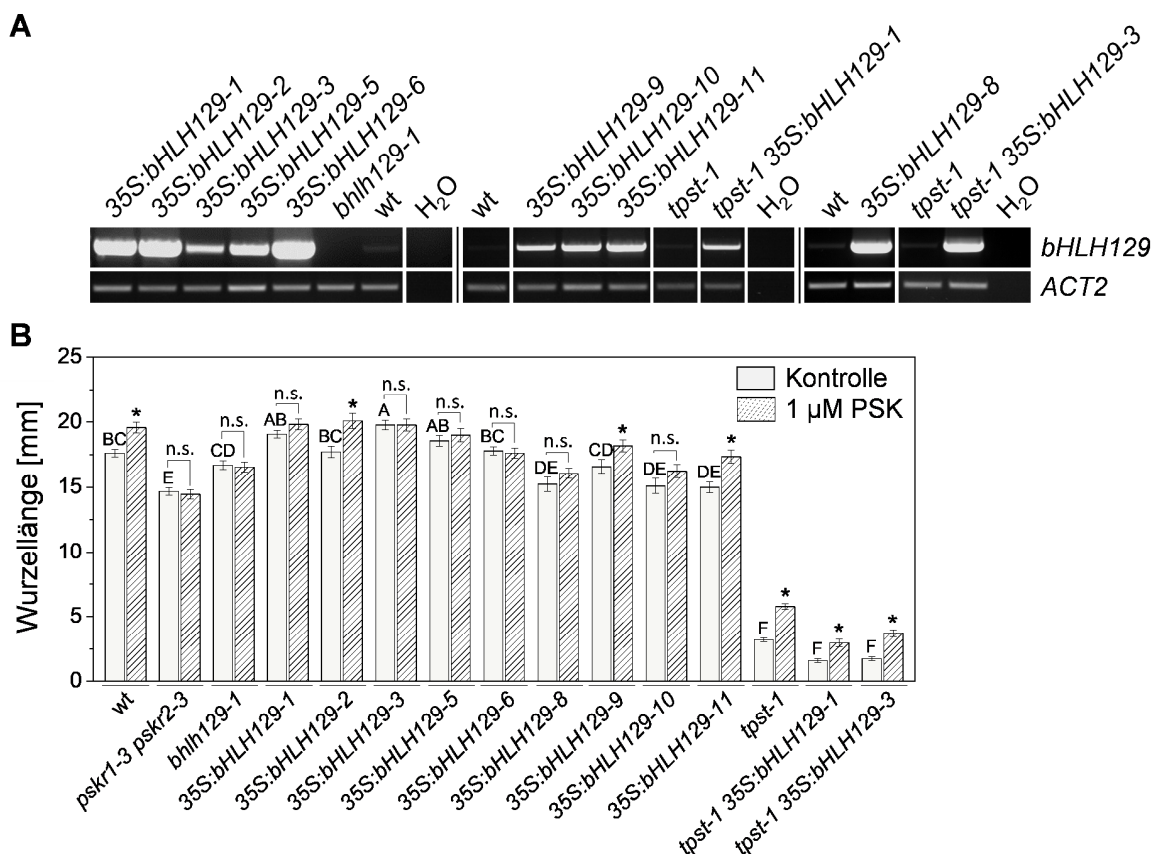


Abbildung 49: bHLH129 beeinflusst die PSK-vermittelte Primärwurzelelongation.

A Expressionsanalyse einer *bHLH129* T-DNA-Insertionslinie (*bhlh129-1*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (*t*-Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 30$).

3.2.4 PSK-regulierte entwicklungspezifische Gene

Zusätzlich zu den in den vorigen Kapiteln beschriebenen TFs wurden drei weitere Gene untersucht, die in dem beschriebenen Microarray (Kapitel 3.2, Seite 68) als PSK-reguliert detektiert worden waren (Tabelle 7). Zum einen ein weiteres Mitglied der bHLH-Familie, welches jedoch nicht an die DNA binden und die Expression direkt regulieren kann (Hyun & Lee, 2006) und zum anderen zwei Mitglieder der OSR-Genfamilie (*organ size related*), die das Wachstum von Organen regulieren. Für diese Gene wurden die gleichen Wachstumsanalysen durchgeführt, wie in den vorigen Kapiteln beschrieben.

Tabelle 7: PSK-regulierte entwicklungsspezifische Gene.

Ergebnisse eines Microarrays (M. Sauter, Daten unveröffentlicht), in dem Wurzeln fünf Tage alter Wildtyp- und *tpst-1*-Keimlinge, mit oder ohne PSK-Behandlung, als Material dienten. Ein Ergebnis wurde als Induktion (blau) bei einem Wert ≥ 2 , und als Repression (orange) bei einem Wert $\leq 0,5$ gewertet.

Genfamilie	Genlokus	Genbezeichnung	Relative Expression		
			<i>tpst-1</i> /wt	<i>tpst-1</i> +PSK/wt	<i>tpst-1</i> +PSK/ <i>tpst-1</i>
bHLH	At3g47710	<i>bHLH161</i> / <i>BNQ3</i> / <i>PRE4</i>	0,17	0,35	2,02
OSR	At3g59900	<i>ARGOS</i>	4,63	1,66	0,36
	At2g44080	<i>ARL</i>	3,6	1,21	0,34

3.2.4.1 Der atypische bHLH-Faktor BNQ3 reguliert die PSK-vermittelte Wurzelelongation

Bei dem durch PSK in seiner Expression induzierten Gen *BNQ3* (*BANQUO 3/basic HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 161, bHLH161/PACLOBUTRAZOL RESISTANCE 4, PRE4*; At3g47710) handelt es sich um ein atypisches Mitglied der bHLH-Familie (siehe Anhang Seite 201 ff.). Die Aminosäuresequenz des Genprodukts verfügt über Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung der eigentlich basischen Region (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Zusammen mit fünf weiteren homologen Proteinen reguliert es das gibberellinabhängige Wachstum des Hypokotyls (Mara *et al.*, 2010). Diese können mit Brassinosteroidsignalweginhibitoren heterodimerisieren und so den Brassinosteroidsignalweg verstärken (Wang *et al.*, 2009). Die durch einen *knockout* des membranständigen Brassinosteroidrezeptors BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) verursachte Reduktion des Sprosswachstums kann durch eine Überexpression von *BNQ3* und seinen homologen Genen reduziert werden (Wang *et al.*, 2009b). Beide wachstumsverstärkenden Effekte von *BNQ3* könnten ein Hinweis auf eine Regulation durch den PSK-Signalweg ein. PSKR1 interagiert nicht mit BRI1 (Ladwig *et al.*, 2015), jedoch gibt es mehrere Hinweise auf eine Verbindung des Brassinosteroidsignalweges mit dem von PSK (Hartmann *et al.*, 2013; Heyman *et al.*, 2013; Holzward *et al.*, 2018b).

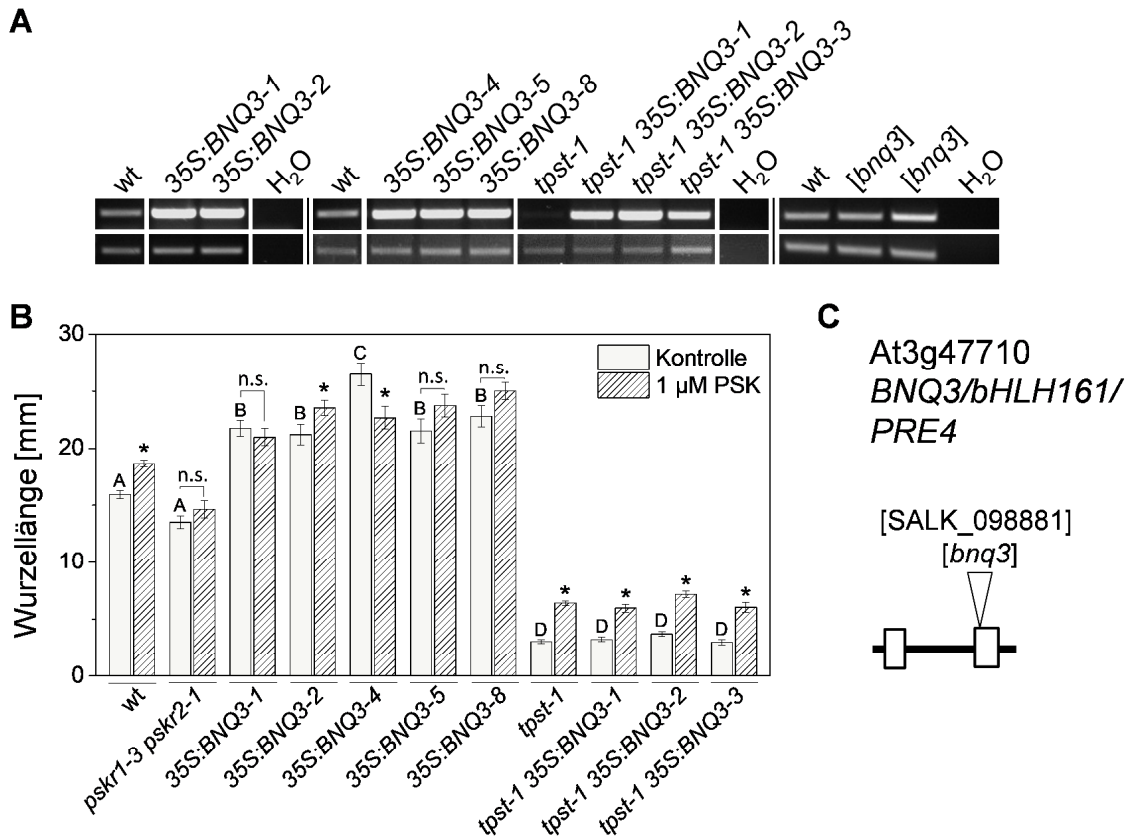


Abbildung 50: BNQ3 reguliert das Primärwurzelwachstum und die PSK-vermittelte Wurzelelongation.

A Expressionsanalyse einer *BNQ3* T-DNA-Insertionslinie (*bnq3*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Eckige Klammern deuten an, dass der Nachweis einer Reduktion der Expressionsstärke in der T-DNA-Insertionslinie nicht möglich war. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (*t*-Test, $p < 0,05$, 2 unabhängige Experimente, $n \geq 27$).

C Exon-Intron-Struktur *BNQ3*. Weiße Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Die T-DNA-Insertion der Linie *bnq3* ist als Dreieck dargestellt.

Für *BNQ3* wurden im Wildtyphintergrund neun Transformanten für eine Überexpression erzeugt. Von diesen waren fünf homozygot für das Überexpressionskonstrukt und zeigten eine verstärkte Expression des Gens (Abbildung 50 A). Im *tpst-1*-Hintergrund wurden lediglich drei Transformanten generiert, die homozygot für weitere Analysen eingesetzt werden konnten und eine Überexpression von *BNQ3* aufwiesen (Abbildung 50 A). Bei einer Untersuchung der T-DNA-Insertionslinie *bnq3* (Mara *et al.*, 2010), mit einer Integration im zweiten Exon (Abbildung 50 C), war ein Nachweis einer homozygoten T-DNA-Insertion nicht möglich. Aus diesem Grund wurde das Saatgut auf kanamycinhaltigem Medium selektiert. Aus Pflanzen, die eine homozygote Resistenz aufwiesen, wurde RNA isoliert und auf eine Reduktion in der *BNQ3*-Expression getestet. Diese konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 50 A). Mara *et al.* (2010) erwähnten einen Prozess mit vier Rückkreuzungen, der hier nicht durchgeführt wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass mehr als eine T-DNA-Integration in der Linie vorhanden war. Möglicherweise würden weitere Rückkreuzungen einen homozygoten *knockout* des Gens hervorbringen, jedoch wurde für

bnq3 zumindest für den Spross kein veränderter Phänotyp beschrieben (Wang *et al.*, 2009b).

Bei der Analyse von *BNQ3*-Überexpressionslinien im Wildtyp und *tpst-1*-Hintergrund konnte der bereits beschriebene Phänotyp mit einem verlängerten Hypokotyl (Anhang Abbildung 71, Seite 211), elongierten Petioli und einer verfrühten Blüte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt) (Lee *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2009b; Mara *et al.*, 2010). Bei der Untersuchung der Primärwurzellänge der Überexpressionslinien im Wildtyphintergrund konnte festgestellt werden, dass die Wurzeln länger waren im Vergleich zum Wildtyp unter Kontrollbedingungen (Abbildung 50 B). Für die *tpst-1*-Mutante konnte dies nicht gezeigt werden. Zudem war in vielen Fällen in den Überexpressionslinien im Wildtyphintergrund keine signifikante Wachstumszunahme in Reaktion auf PSK zu erkennen. Dies wurde als Hinweis darauf gedeutet, dass *BNQ3* die Primärwurzelelongation mit einer Verbindung zum PSK-Signalweg reguliert.

3.2.4.2 Die OSR-Familienmitglieder ARGOS und ARL

Zuletzt wurden zwei der vier Mitglieder der OSR-Genfamilie untersucht, *ARGOS* (*AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE*; At3g59900) und *ARL* (*ARGOS-LIKE*; At2g44080), deren Expression durch PSK reprimiert wird (siehe Anhang Seite 203 ff.). Alle Mitglieder dieser Gruppe sind pflanzenhormonresponsive Gene (Hu *et al.*, 2003; De Paepe *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2015), deren Überexpression zu vergrößerten (Spross-)Organen, hervorgerufen durch vermehrte Zellteilung und/oder -expansion, führt (Hu *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009a; Feng *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2014; Rai *et al.*, 2015). *ARGOS* beeinflusst die Dauer der Zellproliferation (Hu *et al.*, 2003). Eine Überexpression bewirkt unter anderem eine Vergrößerung der Rosettenblätter und eine leicht verlängerte Wurzeln (Hu *et al.*, 2003). Eine Regulierung des Wachstums der Pflanze durch *ARL* ist auf eine Veränderung der Zellgröße zurückzuführen (Hu *et al.*, 2006). Eine Überexpression von *ARL* bewirkt eine Vergrößerung unterschiedlicher Organe, wie den Rosettenblättern, der Wurzel und des Hypokotyls (Hu *et al.*, 2006). *ARL* ist in die brassinosteroidvermittelte Zellexpansion eingebunden und agiert stromabwärts von *BR11* (Hu *et al.*, 2006). Wie bereits erwähnt (Kapitel 3.2.4.1, Seite 99) könnten dies Hinweise auf eine Interaktion mit dem PSK-Signalweg sein.

3.2.4.2.1 Keine Bestätigung der Regulation des Wurzelwachstums durch ARGOS

Für *ARGOS* konnten elf unabhängige Überexpressionslinien hergestellt, die in der T₄-Generation nicht segregierten, für die eine verstärkte Expression jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abbildung 51 A). Im *tpst-1*-Hintergrund wurden fünf Transformanten generierte, von denen drei in der T₃-Generation homozygot waren. Diese wiesen ebenfalls keine Zunahme des *ARGOS*-Transkripts auf (Abbildung 51 A). Eine

Untersuchung der T-DNA-Insertionslinie *argos-1* (Feng *et al.*, 2011), mit einer Insertion im 5'-UTR 254 Basen vor dem Startcodon (Abbildung 51 C), konnte nicht durchgeführt werden, da kein Nachweis einer homozygoten T-DNA-Insertion möglich war. Auch nach Selektion mit BASTA® und der Analyse der resistenten Pflanzen, war keine Reduktion der Expression nachweisbar (Abbildung 51 A). Dies könnte ein Hinweis auf mehrfache T-DNA-Integrationen sein und würde weitere Rückkreuzungsschritte erfordern. Nichtsdestotrotz ist kein Phänotyp für einen Einzel-*knockout* des Gens, sondern nur für multiple T-DNA-Insertionen in der OSR-Gruppe beschrieben (Feng *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2014), was eine Kreuzung mit anderen Linien erfordern würde.

Die mit ARGOS-Überexpressionskonstrukten transformierten Pflanzen wiesen im Wildtyp hintergrund unterschiedlich lange Primärwurzeln im Vergleich zum Wildtyp auf. Eine Tendenz zu einer verlängerten Wurzel, wie durch Hu *et al.* (2003) erwähnt, konnte nicht beobachtet werden. Dies könnte auf eine fehlende oder schwache Überexpression zurückzuführen sein (Abbildung 51 A). Bei der Wachstumsreaktion auf PSK war kein Unterschied zum Wildtyp feststellbar. Gleiches galt bezüglich der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen und für die Reaktion auf PSK der *tpst-1*-Mutanten. Zudem wiesen alle Linien eine extrem schlechte Keimungsrate auf, was Ursache für die geringe Anzahl an Individuen im beschriebenen Experiment ist. In Abstimmung mit bereits veröffentlichten Daten ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ARGOS das Primärwurzelswachstum reguliert, dies konnte jedoch in den hier durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden. Auch eine Einbindung in den PSK-Signalweg war aus diesen Ergebnissen nicht ersichtlich.

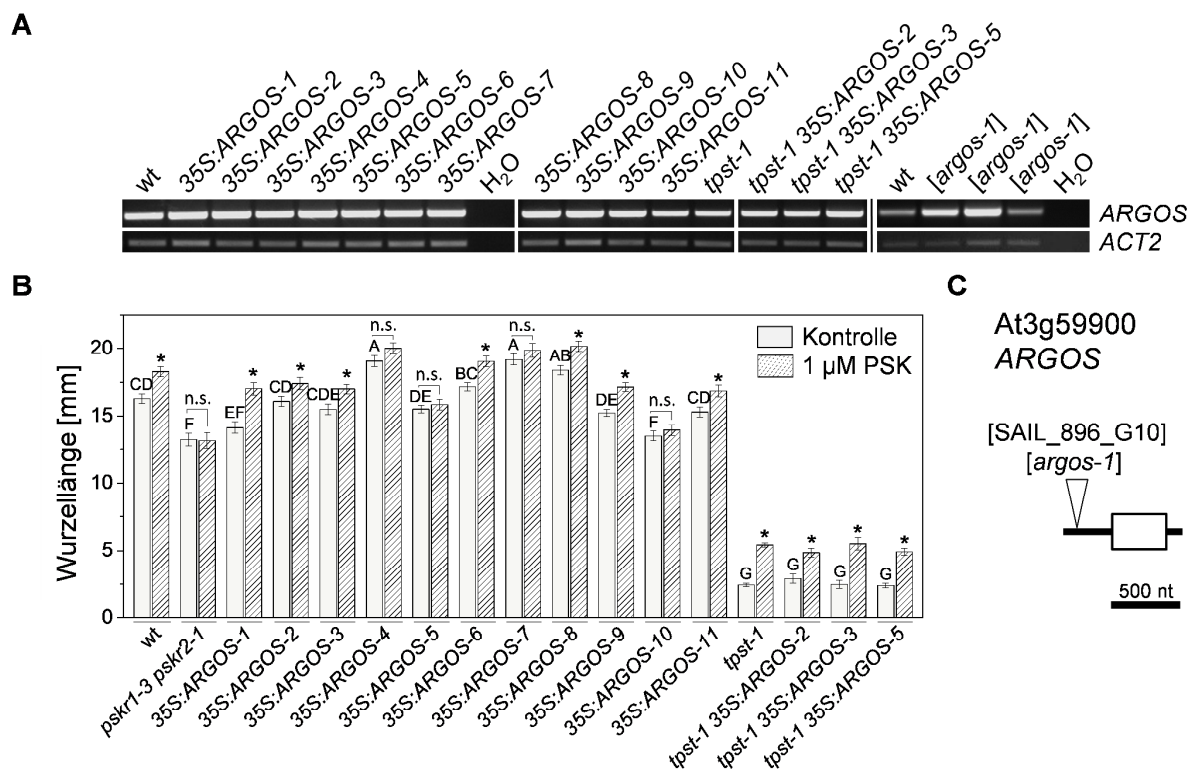


Abbildung 51: ARGOS reguliert nicht die PSK-vermittelte Wurzelelongation.

A Expressionsanalyse einer ARGOS T-DNA-Insertionslinie (*argos-1*) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Eckige Klammern deuten an, dass der Nachweis einer Reduktion der Expressionsstärke in der T-DNA-Insertionslinie nicht möglich war. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (t -Test, $p < 0,05$, 2 unabhängige, $n \geq 15$).

C Exon-Intron-Struktur ARGOS. Weiße Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Die T-DNA-Insertion der Linie *argos-1* ist als Dreieck dargestellt.

3.2.4.2.2 Eine Regulation des Wurzelwachstums durch ARL ließ sich nicht bestätigen

Bei der Herstellung von Überexpressionslinien für *ARL* im Wildtyphintergrund wurden elf Transformanten generiert. Für sieben der Linien konnte eine homozygote Vererbung des Konstruktes bestätigt werden. Diese wiesen jedoch keine eindeutige Erhöhung der Transkriptmenge auf (Abbildung 52 A). Gleiches galt für die im *tpst-1*-Hintergrund generierten Linien, bei denen drei von sieben unabhängigen Linien das Konstrukt homozygot in sich trugen. In vorangegangenen Veröffentlichungen (Feng *et al.*, 2011) wurden RNAi-Linien für die Analyse der Auswirkungen einer Reduktion des *ARL*-Genprodukts verwendet. Hier wurde eine T-DNA-Insertionslinie (GK_079D09), mit einer Integration am Ende des Exons, auf eine Reduktion der Expression von *ARL* hin untersucht (Abbildung 52 C). Da keine Reduktion der Expressionsstärke nachzuweisen war, wurde diese Linie verworfen.

Hu *et al.* (2006) beschrieben eine leichte Zunahme der Wurzellänge bei einer Überexpression von *ARL*. Dies war in den hier hergestellten Überexpressionslinien sowohl im Wildtyp- als auch im *tpst-1*-Hintergrund nicht nachweisbar (Abbildung 52 B). Dies könnte allerdings auf das Fehlen einer Überexpression von *ARGOS* zurückzuführen sein (Abbildung 52 A). Wie bei den Analysen zu *ARGOS* war in den hier untersuchten Linien keine veränderte Wachstumsreaktion auf PSK im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Es besteht, aufgrund bereits veröffentlichter Daten, die Annahme, dass *ARL* die Primärwurzelelongation reguliert, jedoch war dies in den hier durchgeführten Versuchen nicht ersichtlich. Zudem war keine Einbindung in den PSK-Signalweg nachweisbar.

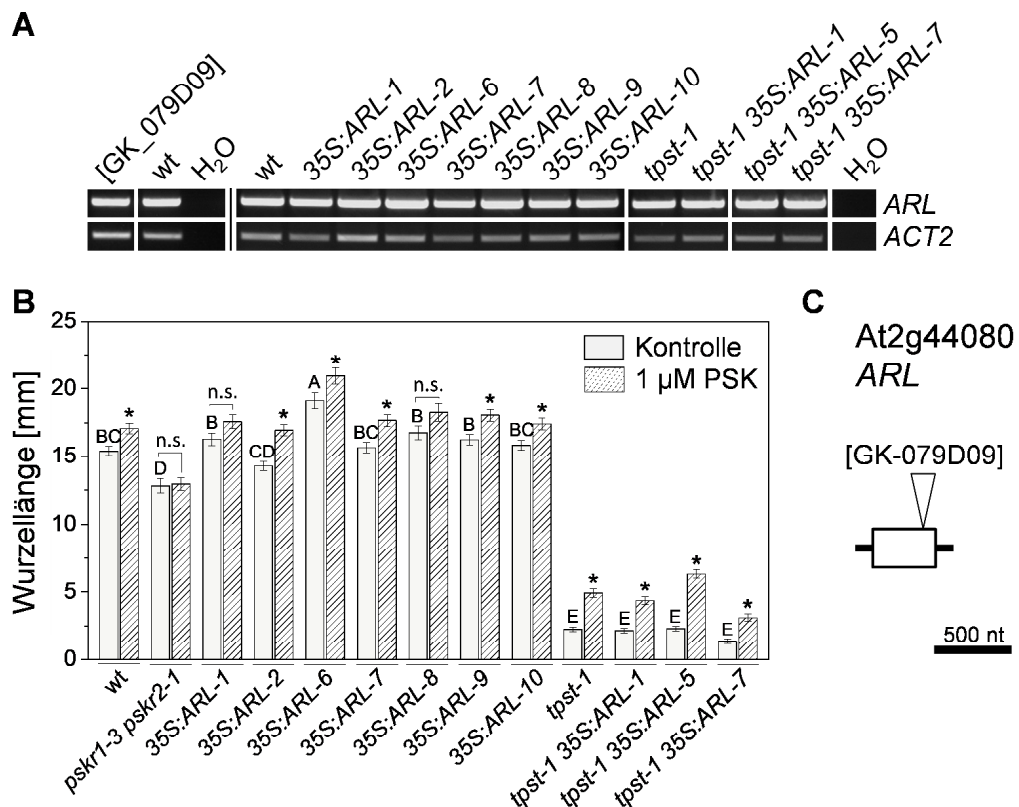


Abbildung 52: ARL reguliert nicht die PSK-vermittelte Wurzelelongation.

A Expressionsanalyse einer *ARL* T-DNA-Insertionslinie (GK_079D09) und von Überexpressionslinien im Wildtyp- und *tpst-1*-Hintergrund. Schwarze Striche separieren unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Eckige Klammern weisen darauf hin, dass die T-DNA-Insertion zu keiner Expressionsreduktion führt.

B Primärwurzellänge (\pm SE) fünf Tage alter Keimlinge, angezogen mit oder ohne PSK. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen an (einfaktorielle ANOVA, $P < 0,05$), Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle eines Genotyps an (*t*-Test, $p < 0,05$, 2 unabhängige, $n \geq 32$).

C Exon-Intron-Struktur *ARL*. Weiße Kästen repräsentieren Exons, schwarze Linien zwischen den Kästen Introns. Die T-DNA-Insertion der Linie GK_079D09 ist als Dreieck dargestellt.

Da keine homozygote T-DNA-Insertionslinie für *ARGOS* identifiziert werden konnte und sich auch die T-DNA-Insertion in *ARL* nicht als *knockout* herausstellte, konnten in dieser Arbeit keine Mehrfachmutationen zur Reduktion der Expressionsstärke der PSK-regulierten OSR-Familienmitglieder hergestellt und untersucht werden.

3.2.5 PSK-regulierte Gene zeigen unterschiedliche Einflüsse auf die Primärwurzelelongation

Durch die Nutzung von Überexpressions- und/oder *knockout*-Linien konnte gezeigt werden, dass elf von 17 PSK-regulierten Genen das Wachstum der Primärwurzel von Keimlingen regulieren (Tabelle 8). Eine Aussage über die Funktion von Genen im Primärwurzelwachstum, für die entweder nur Überexpressionslinien oder eine *knockout*-Linie zur Verfügung standen, lässt sich kaum treffen. Überexpressionslinien im *tpst-1*-Hintergrund erwiesen sich bei der Analyse als wenig hilfreich, da eine Reduktion oder Verstärkung der PSK-Antwort in der Mutante durch eine hohe Varianz der Antwortstärke nicht eindeutig zu quantifizieren und differenzieren war. Aufgrund dessen wurden ausschließlich Überexpressions- und T-DNA-Insertionslinien im Wildtyphintergrund zur weiteren Auswertung genutzt.

Nicht in die Regulation des Wurzelwachstums eingebunden waren die Genprodukte von *GAZ*, *DOF1.2*, *NAC015*, *STZ*, *ARGOS* und *ARL*, da Pflanzen mit einer veränderten Expression dieser Gene unter Kontrollbedingungen kein verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Tabelle 8). Dies widersprach teilweise der aktuellen Literatur (Hu *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006). Zusätzlich wiesen die unterschiedlichen Linien keine veränderte Wachstumsreaktion auf PSK auf. Alle restlichen untersuchten Kandidaten führten bei vermehrter und/oder reduzierter Expression zu einer Veränderung der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen und/oder einer veränderten Wachstumsantwort auf PSK.

Tabelle 8: PSK-regulierte Gene beeinflussen die PSK-abhängige Wurzelelongation zu unterschiedlichem Grad.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Wachstumsanalysen PSK-regulierter Gene. Pfeile nach unten = Expression reprimiert durch PSK, Pfeile nach oben = Expression induziert durch PSK. ox = Überexpressionslinie(n), ko = T-DNA-Insertionslinie, 0 = keine veränderte Wurzellänge im Vergleich zum Wildtyp bei gleicher Behandlung, -- keine zusätzliche Wurzelelongation bei PSK-Zugabe, (--) verminderte Wurzelelongation im Vergleich zum Wildtyp bei PSK-Zugabe, + längere Wurzel als Wildtyp, (+) Tendenz einer verlängerten Wurzel, - verkürzte Wurzel im Vergleich zum Wildtyp. orange unterlegt = Repression durch PSK oder durch TF vermindertes Wurzelwachstum, blau unterlegt = Induktion durch PSK oder durch TF verstärktes Wurzelwachstum.

	Genbezeichnung	untersuchte Linien	Veränderung der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen	Veränderung der PSK-Antwort		
↓	<i>GAZ</i>	ox	0	0	PSK-Antwort unverändert	Wurzelwachstum unverändert
↓	<i>DOF1.2</i>	ox	0	0		
↓	<i>NAC015</i>	ox / ko	0 / 0	0 / 0		
↓	<i>STZ</i>	ko	0	0		
↓	<i>ARGOS</i>	ox	0	0		
↓	<i>ARL</i>	ox	0	0		
↑	<i>AGL17</i>	ox / ko	+ / -	0 / 0		
↑	<i>AGL21</i>	ox / ko	(+) / 0	0 / 0		Wurzelwachstum verändert
↑	<i>MYB88</i>	ox / ko	+ / 0	0 / 0		
↓	<i>NAC031</i>	ox / ko	+ / +	0 / 0		
↓	<i>WRKY48</i>	ko	-	0		
↓	<i>RAP2.3</i>	ox / ko	- / 0	0 / 0		
↓	<i>HB24</i>	ox / ko	- / -	0 / 0		
↓	<i>PDF2</i>	ox / ko	(+) / -	-- / 0		
↓	<i>bHLH129</i>	ox / ko	0 / 0	-- / --	PSK-Antwort reduziert	
↓	<i>NAC068</i>	ox	0	(--)		
↑	<i>AGL17 AGL21</i>	ko	(+)	--		
↑	<i>BNQ3</i>	ox	+	--		

Eine Funktion der Genprodukte von *NAC031* und *HB24* im PSK-Signalweg ist unwahrscheinlich, da sowohl bei einer Überexpression als auch bei einer T-DNA-Insertion keine Veränderung der Wurzelelongation in Antwort auf PSK im Vergleich zum Wildtyp auftrat (Tabelle 8). Auffällig für die TFs, die ein verändertes Wachstum ohne veränderte PSK-Antwort aufwiesen, war, dass durch PSK induzierte Gene ein verstärktes Wachstum der Wurzel bei einer Überexpression zeigten. Für *MYB88*, *WRKY48* und *RAP2.3*, sowie *AGL17* und *AGL21* ließ sich so eine Einbindung in die PSK-vermittelte Wurzelelongation nicht nachweisen, jedoch auch nicht ausschließen. Die übrigen Kandidaten wiesen eine reduzierte Reaktion bei PSK-Zugabe auf, waren jedoch nicht alle bezüglich der Wurzellänge unter Kontrollbedingungen verändert. Eine verstärkte Wachstumsreaktion auf PSK war schwierig zu quantifizieren und wurde deshalb nicht untersucht. Für *PDF2*, *bHLH129*, *NAC068*, *BNQ3* und *AGL17* zusammen mit *AGL21* ist eine Funktion im PSK-Signalweg bezüglich der Primärwurzelelongation sehr wahrscheinlich. Da bei einer veränderten Expression dieser Gene eine Wachstumszunahme, hervorgerufen durch PSK, nicht stattfand (Tabelle 8).

3.3 PSK-regulierte Gene werden durch osmotischen Stress reguliert

Bei den durchgeführten Analysen zur PSK-vermittelten Wurzelelongation in Verbindung mit TF- und anderen Genen konnte kein Kandidat identifiziert werden, der als alleiniger TF das Signal zur Elongation der Wurzel durch PSK weiterleitet und wachstumsfördernde Gene aktiviert oder die Expression wachstumsreprimierender Gene inhibiert. Auffällig war jedoch, dass neun von 17 PSK-regulierten Genen laut Veröffentlichungen in Stressantworten wirken (Tabelle 6, Seite 71). Da bereits gezeigt wurde, dass der PSK-Signalweg die osmotische Stressantwort reguliert, wurde mit Hilfe einer Datenbankanalyse untersucht, inwiefern die in dieser Arbeit untersuchten, PSK-regulierten Gene in die osmotische Stressantwort involviert sind (Tabelle 9). Für *BNQ3* und *NAC068* waren keine Daten verfügbar. In der Analyse konnte festgestellt werden, dass die Expression von elf Genen durch osmotischen Stress und teilweise durch das Stresshormon ABA reguliert wird. *RAP2.3*, *ARGOS*, *ARL*, *STZ* und *WRKY48* wurden durch osmotischen Stress um mehr als 10% im Vergleich zu Kontrollbedingungen induziert. Für *HB24*, *ERF104*, *ARL*, *STZ* und *WRKY48* wurde die Expressionszunahme im Spross und für *RAP2.3*, *ARGOS* und zusätzlich sowohl *ARL* als auch *STZ* in der Wurzel nachgewiesen. *STZ* und *WRKY48* wurden zudem durch ABA induziert. Um mehr als 10% im Vergleich zur Expression unter Kontrollbedingungen in Antwort auf osmotischen Stress wurden im Spross *ESE3* und *MYB88* reprimiert, in der Wurzel *PDF2* und *bHLH129*. Letzteres Gen wurde zusätzlich in Antwort auf ABA reprimiert.

Tabelle 9: Einige PSK-regulierte Gene werden bei osmotischen Stressbedingungen und in Antwort auf ABA differentiell exprimiert.

Aufgeführt sind die Expressionsänderungen der in dieser Arbeit untersuchten PSK-regulierten Gene bei osmotischem Stress und in Antwort auf ABA, entnommen aus der Datenbank Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008), dargestellt als prozentuale Veränderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Originaldaten sowie eine Aufschlüsselung, um welche verwendeten Daten es sich handelt, sind dem Anhang (Tabelle 16, Seite 181) zu entnehmen. Für *NAC068* und *BNQ3* existieren keine Expressionsdaten in der Datenbank. blau: induziert, orange: reprimiert, grau: nicht reguliert.

Familie	Genbezeichnung	Genlokus	osmotischer Stress Spross	osmotischer Stress Wurzel	ABA	Expressionsänderung [%]
MADS-Box	<i>AGL17</i>	At2g22630	-1,4	2,3	0,2	50,0
	<i>AGL21</i>	At4g37940	1,2	4,2	0,5	40,0
AP2/EREBP	<i>RAP2.3</i>	At3g16770	-1,4	10,1	-2,6	30,0
	<i>ESE3</i>	At5g25190	-12,6	-0,9	-7,1	20,0
	<i>ERF104</i>	At5g61600	17,5	5,2	-1,1	10,0
HB	<i>HB24</i>	At2g18350	18,1	3,2	5,9	0,0
	<i>PDF2</i>	At4g04890	-6,5	-11,6	-3,4	-10,0
Zinkfinger	<i>DOF1.2</i>	At1g21340	-0,3	1,5	1,8	-20,0
	<i>STZ</i>	At1g27730	42,4	14,3	17,7	-30,0
	<i>GAZ</i>	At2g18490	0,3	1,2	0,4	
	<i>WRKY48</i>	At5g49520	16,8	5,9	16,1	
NAC	<i>NAC015</i>	At1g33280	2,1	-6,5	0,5	
	<i>NAC031</i>	At1g76420	1,6	2,5	-1,3	
andere	<i>MYB88</i>	At2g02820	-10,6	2,0	-2,6	
	<i>bHLH129</i>	At2g43140	-2,2	-25,3	-10,3	
	<i>ARL</i>	At2g44080	22,8	10,3	7,1	
	<i>ARGOS</i>	At3g59900	9,0	24,4	7,7	

3.4 PSK-regulierte Gene können in der osmotischen Stressantwort wirken

Obwohl die Identifikation PSK-regulierter TFs und entwicklungspezifischer Gene ausschließlich auf Expressionsänderungen in der Wurzel basiert, wurde für einige dieser Gene untersucht, ob diese in der osmotischen Stressantwort im Spross wirken. Hier wurden die Gene *RAP2.3*, *HB24*, *bHLH129*, *AGL17* mit *AGL21* und *BNQ3* bezüglich ihres Sprossfrischgewichts in Antwort auf Mannitol analysiert. *RAP2.3* und *HB24* gehören in die Gruppe der Gene, bei denen eine Überexpression zu einem reduzierten Wurzelwachstum geführt, jedoch keine vom Wildtyp abweichende Reaktion auf PSK stattgefunden hatte. Zusätzlich war für *HB24* bei einem *knockout* eine verkürzte Primärwurzel zu beobachten. Die restlichen Gene zeigten keine Wurzelelongation in Antwort auf PSK bei einer Überexpression (*bHLH129*, *BNQ3*) oder einem *knockout* (*bHLH129*, *AGL17*, *AGL21*) und unterschiedliche Phänotypen bezüglich der Wurzellänge im Vergleich zum Wildtyp.

3.4.1 RAP2.3 reguliert nicht das Sprosswachstum bei mäßigem osmotischem Stress

Es wurde bereits beschrieben, dass bei einer induzierten Expression von *RAP2.3* keine Unterschiede in der Rosettengröße im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen sind und dass Überexpressionslinien in Antwort auf 300 mM Mannitol eine geringere Reduktion der Rosettengröße im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Papdi *et al.*, 2015). Zudem wurde gezeigt, dass ein Einzel-*knockout* von *RAP2.3* unter Kontrollbedingungen und bei osmotischem Stress keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp aufweist, ein Doppel-*knockout* zusammen mit *RAP2.12* (*RELATED TO AP2 12*) jedoch eine verstärkte Reduktion der Rosettengröße bei osmotischem Stress im Vergleich zum Wildtyp zeigt (Papdi *et al.*, 2015).

In den hier durchgeführten Versuchen konnte bestätigt werden, dass weder ein Einzel-*knockout* noch eine Überexpression der Gene das Sprosswachstum unter Kontrollbedingungen beeinflussen (Abbildung 53). Gleiches galt für die *erfVII*-Mutante. Bei osmotischem Stress war bei den gewählten Behandlungsbedingungen keine Abweichung des Sprossgewichts aller untersuchten Linien im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten.

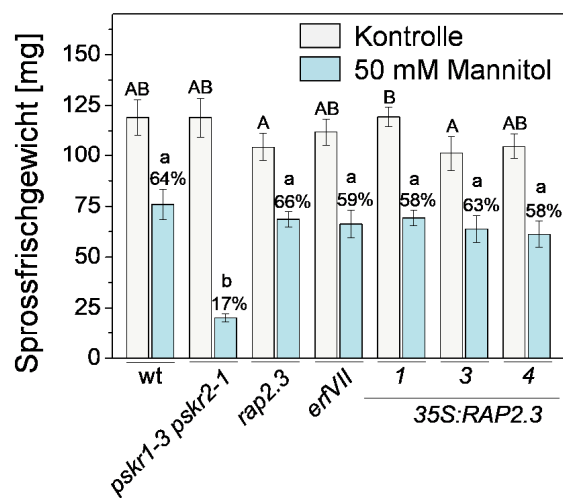


Abbildung 53: RAP2.3 hat keinen Einfluss auf das Sprosswachstum bei mäßigem osmotischem Stress.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war und nach weiteren 21 Tagen Anzucht analysiert. Es wurde das Sprossfrischgewicht (\pm SE) der *knockout*-Linien *rap2.3* und *erfVII* sowie der Überexpressionslinien *35S:RAP2.3-1*, *-3* und *-4* im Vergleich zu Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Pflanzen analysiert. Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Sprossfrischgewichts unter Kontrollbedingungen. Bei der Mannitolbehandlung erzielte Daten wurden als prozentualer Anteil des Sprossfrischgewichts der jeweiligen Linie unter Kontrollbedingungen berechnet und die statistischen Unterschiede mit Kleinbuchstaben dargestellt (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 18$).

3.4.2 HB24 bewirkt eine Reduktion des Sprossfrischgewichts bei osmotischem Stress

Sowohl eine potentielle, aber nicht nachweisbare, Überexpression als auch ein *knockout* von *HB24* wirkten sich nicht auf das Sprosswachstum unter Kontrollbedingungen aus (Abbildung 54). Unter osmotischem Stress zeigte eine potentielle Überexpressionslinie ein reduziertes Wachstum des Sprosses im Vergleich zum Wildtyp. Drei weitere Linien zeigten die Tendenz einer Reduktion des Sprossgewichts. Ein *knockout* hatte bei osmotischem Stress keinen Einfluss auf das Wachstum des Sprosses. Für eine zuverlässige Aussage, wäre eine dritte Durchführung des Versuches von Vorteil gewesen. Bei einem Vergleich der Experimente zur Wurzelelongation und osmotischen Stressantwort fiel auf, dass die Linien *35S:HB24-6*, *-7* und *-11* die geringste Wurzellänge aufwiesen (Abbildung 34, Seite 81) und das geringste Sprossgewicht ebenfalls in Linie *35S:HB24-6* und *-7* zu beobachten war. Dass eine Reduktion der Wurzellänge mit einer verstärkten Reduktion des Sprosswachstums unter osmotischen Stressbedingungen einhergeht, ähnelt dem Phänotyp von *pskr1-3 pskr2-1* und könnte ein Hinweis auf eine Interaktion von *HB24* mit dem PSK-Signalweg bei osmotischem Stress sein.

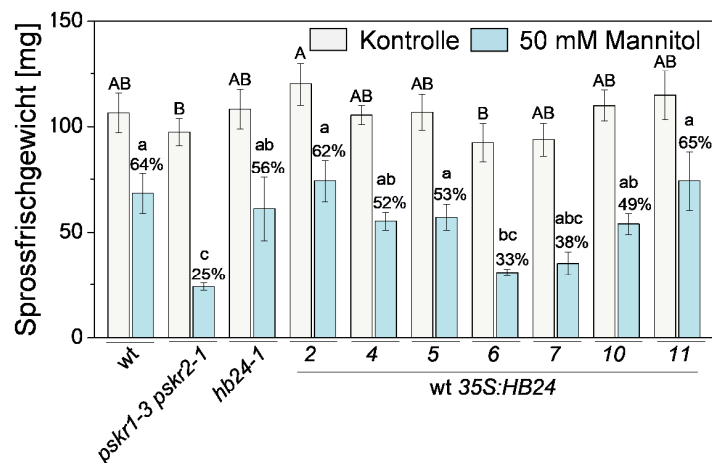


Abbildung 54: HB24 kann eine Reduktion des Sprossgewichts bei osmotischem Stress bewirken.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war und nach weiteren 21 Tagen Anzucht analysiert. Es wurde das Sprossfrischgewicht (\pm SE) der *knockout*-Linie *hb24-1* sowie der Überexpressionslinien *35S:HB24-2*, *-4*, *-5*, *-6*, *-7*, *-10* und *-11* im Vergleich zu Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Pflanzen analysiert. Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Sprossfrischgewichts unter Kontrollbedingungen. Bei der Mannitolbehandlung erzielte Daten wurden als prozentualer Anteil des Sprossfrischgewichts der jeweiligen Linie unter Kontrollbedingungen berechnet und die statistischen Unterschiede mit Kleinbuchstaben dargestellt (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, zwei Experimente, $n = 12$).

3.4.3 bHLH129 bewirkt eine Reduktion des Sprossfrischgewichts

Für *bHLH129* ist beschrieben, dass die Expression des TFs durch das Stresshormon ABA in Keimlingen reprimiert wird (Tian *et al.*, 2015), genauso wie durch PSK in der Wurzel (Tabelle 5, Anhang Abbildung 69). Diese Daten wurden durch qRT-PCR in den ersten echten Blättern in Antwort auf osmotischen Stress und ABA im Wildtyp und in *pskr1-3 pskr2-1* überprüft (Abbildung 55 A). Auch im Spross war eine Reduktion der Expression sowohl im Wildtyp als auch in *pskr1-3 pskr2-1* durch ABA zu verzeichnen. Osmotischer Stress hatte keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf die Expression von *bHLH129*.

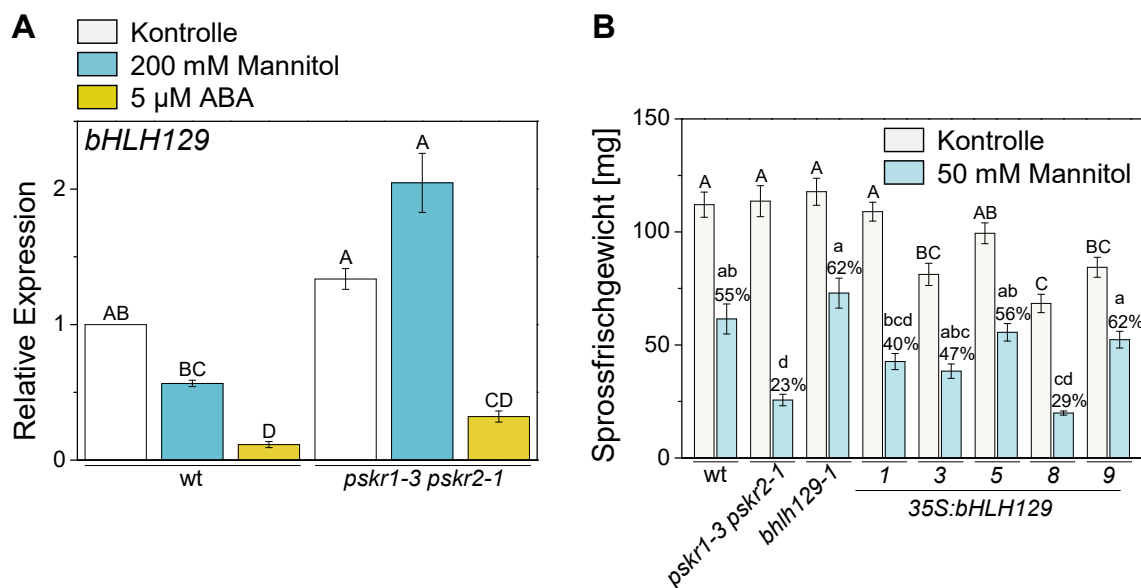


Abbildung 55: bHLH129 inhibiert das Sprosswachstum, auch unter osmotischem Stress.

A Sieben Tage alte Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Keimlinge wurden auf Medium mit oder ohne Mannitol oder ABA transferiert und für weitere 24 h angezogen. Die relative Expression (\pm SE) von *bHLH129* wurde in den ersten echten Blättern untersucht. Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, 3 biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen, $n = 6$).

B Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war und nach weiteren 21 Tagen Anzucht analysiert. Es wurde das Sprossfrischgewicht (\pm SE) der *knockout*-Linie *bhlh129-1* sowie der Überexpressionslinien 35S:*bHLH129*-1, -3, -5, -8 und -9 im Vergleich zu Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Pflanzen analysiert. Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Sprossfrischgewichts unter Kontrollbedingungen. Bei der Mannitolbehandlung erzielte Daten wurden als prozentualer Anteil des Sprossfrischgewichts der jeweiligen Linie unter Kontrollbedingungen berechnet und die statistischen Unterschiede mit Kleinbuchstaben dargestellt (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, drei Experimente, $n \geq 18$).

Obwohl osmotischer Stress keine Veränderung der Expression von *bHLH129* hervorrief, wurde dennoch das Sprosswachstum von *bHLH129*-Überexpressionslinien und der *knockout*-Linie *bhlh129-1* bei osmotischem Stress untersucht (Abbildung 55 A). Die verwendeten Überexpressionslinien wurden ausgewählt, da sie unterschiedlich starke Überexpressionsraten und im Vergleich zum Wildtyp sowohl kürzere als auch längere und vergleichbare Wurzellängen aufwiesen (vgl. Abbildung 49, Seite 98). Unter Kontrollbedingungen war das Sprosswachstum der *knockout*-Linie unverändert, wohingegen drei der fünf Überexpressionslinien ein reduziertes Sprosswachstum aufwiesen. Bei

osmotischem Stress zeigte eine der fünf Überexpressionslinien eine Reduktion des Sprosswachstums im Vergleich zum Wildtyp bis auf das Niveau von *pskr1-3 pskr2-1*. bHLH129 reprimiert somit das Sprosswachstum, jedoch ist die PSK-abhängige Wachstumsregulation unabhängig einer Regulation durch bHLH129.

3.4.4 AGL17 und AGL21 regulieren nicht das Sprosswachstum bei osmotischem Stress

agl17-1 agl21-3 hatte keinen Wachstumszuwachs der Wurzel in Antwort auf PSK gezeigt (Abbildung 30, Seite 76). Deshalb wurde die Doppelmutante in Hinblick auf eine Wachstumsantwort bei osmotischem Stress analysiert. Unter Kontrollbedingungen war die Tendenz einer Reduktion des Gewichtes zu beobachten (Abbildung 56). Jedoch konnte keine Veränderung des Sprossgewichts unter osmotischem Stress beobachtet werden. Dieser Versuch wurde lediglich einmal durchgeführt, sodass die getroffenen Aussagen vorbehaltlich einer Wiederholung des Experiments sind.

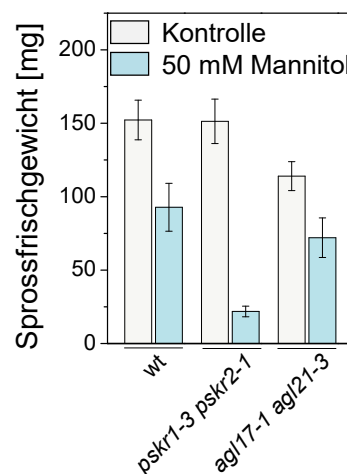


Abbildung 56: Verlust von AGL17 und AGL21 hat keinen Einfluss auf das Sprosswachstum bei osmotischem Stress.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war und nach weiteren 21 Tagen Anzucht analysiert. Es wurde das Sprossfrischgewicht (\pm SE) der *knockout*-Linie *agl17-1 agl21-3* im Vergleich zu Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Pflanzen analysiert. Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Sprossfrischgewichts unter Kontrollbedingungen. Bei der Mannitolbehandlung erzielte Daten wurden als prozentualer Anteil des Sprossfrischgewichts der jeweiligen Linie unter Kontrollbedingungen berechnet und die statistischen Unterschiede mit Kleinbuchstaben dargestellt (ein Experiment, n = 6).

3.4.5 BNQ3 inhibiert das Sprosswachstum, verstärkt durch osmotischen Stress

Zur Untersuchung der Regulation des Sprosswachstums durch BNQ3 bei osmotischem Stress wurden zwei Überexpressionslinien im Wildtypintergrund eingesetzt. Es wurden zwei Linien in einem Versuch verwendet, da eine *BNQ3*-Überexpression zu einer Reduzierung der Saatgutproduktion führte. Diese Linien zeigten die Tendenz einer Reduktion des Sprossgewichts im Vergleich zum Wildtyp unter Kontrollbedingungen. Die hier verwendeten Überexpressionslinien zeigten eine Elongation in den Petioli, die Blattspreite wirkte jedoch filigraner (Bilder nicht gezeigt), was die Reduktion des Sprossgewichts erklären würde. Zusätzlich war die Tendenz einer verstärkten Reduktion des Sprossgewichts unter osmotischem Stress zu beobachten, was ein weiterer Hinweis darauf sein könnte, dass BNQ3 und PSK in demselben Signalweg wirken könnten. Vorbehaltlich einer Wiederholung des Versuchs reprimiert BNQ3 das Sprosswachstum, welcher Effekt bei osmotischem Stress verstärkt wird.

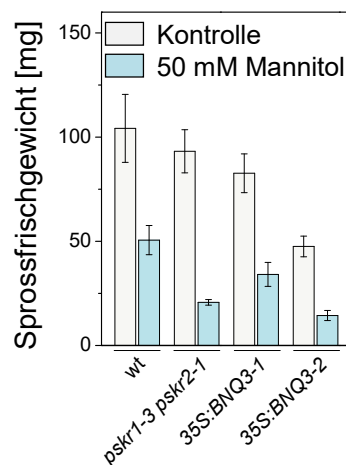


Abbildung 57: BNQ3 inhibiert das Sprosswachstum.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war und nach weiteren 21 Tagen Anzucht analysiert. Es wurden die Überexpressionslinien *35S:BNQ3-1* und *-2* im Vergleich zu Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Pflanzen analysiert. Sprossfrischgewicht (\pm SE) bei Mannitolbehandlung, Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Sprossfrischgewichts unter Kontrollbedingungen. Bei der Mannitolbehandlung erzielte Daten wurden als prozentualer Anteil des Sprossfrischgewichts der jeweiligen Linie unter Kontrollbedingungen berechnet und die statistischen Unterschiede mit Kleinbuchstaben dargestellt (ein Experiment, $n = 6$).

4 Diskussion

Das Peptidhormon PSK reguliert in *Arabidopsis* das Wachstum und die biotische Stressantwort der Pflanze. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PSK die osmotische Stressresistenz durch Interaktion mit dem ABA-Signalweg unterstützt. Zusätzlich wurden PSK-regulierte Transkriptionsfaktoren und entwicklungsspezifische Gene hinsichtlich ihrer Regulation des PSK-abhängigen Wachstums der Pflanze untersucht. Hierbei wurden Gene identifiziert, deren Aktivität das Wachstum und die osmotische Stressantwort der Pflanze, teilweise in Abhängigkeit von PSK, regulieren.

4.1 PSKR1-Signalwirkung unterstützt die osmotische Stressresistenz

Bei einer reduzierten Wasserverfügbarkeit entsteht osmotischer Stress in der Pflanze, durch den das Wachstum und die Morphogenese verändert werden kann. Das Sprosswachstum wird, stärker als das Wurzelwachstum, sowohl bei moderatem als auch bei starkem osmotischem Stress inhibiert (French & Turner, 1991; Spollen *et al.*, 1993; Shao *et al.*, 2008; Bouteillé, 2011; Claeys *et al.*, 2014). Es wird angenommen, dass diese Wachstumsreduktion von einer verringerten Zellexpansion herrührt (Maggio *et al.*, 2006; Zonia & Munnik, 2007). PSK fördert das Wachstum über eine gesteigerte Zellexpansion (Kutschmar *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2013), was durch osmotischen Stress beeinflusst werden könnte.

Bereits bei schwachem osmotischem Stress konnte die Rezeptornullmutante *pskr1-3 pskr2-1*, im Gegensatz zum Wildtyp und *PSKR1*-Überexpressionslinien, das Sprosswachstum nicht aufrechterhalten. Wie schon für die Wachstums- und die Pathogenantwort nachgewiesen (Kutschmar *et al.*, 2009; Stührwohldt *et al.*, 2011; Igarashi *et al.*, 2012; Hartmann *et al.*, 2013), ist beim Erhalt des Wachstums unter osmotischem Stress *PSKR1* der Hauptvermittler des PSK-Signals. *pskr1-3* zeigte dieselbe verstärkte Wachstumsreduktion bei osmotischem Stress wie *pskr1-3 pskr2-1* wohingegen *pskr2-1* sich nicht vom Wildtyp unterschied. Die Funktion von *PSKR2* ist weiterhin unbekannt. Bisher waren wachstumsfördernde Effekte, unabhängig von abiotischen Stressoren, und eine Regulation der biotischen Stressantwort durch PSK bekannt (Matsubayashi *et al.*, 2006; Kutschmar *et al.*, 2009; Loivamäki *et al.*, 2010; Stührwohldt *et al.*, 2011; Igarashi *et al.*, 2012; Mosher *et al.*, 2013; Shen & Diener, 2013; Hartmann *et al.*, 2014; Stührwohldt *et al.*, 2014; Rodiuc *et al.*, 2016). Diese Arbeit zeigt, dass der PSK-Signalweg auch unter abiotischen Stressbedingungen das Wachstum der Pflanze unterstützt.

4.2 *PSKR1*- und *PSK*-Gene werden durch osmotischen Stress und ABA in jungen Sprossgeweben induziert

Das Phytohormon ABA agiert als hormoneller Stresssignalvermittler. Bei osmotischem Stress ist die Konzentration des Phytohormons in der Pflanze erhöht. ABA induziert die Regulation von metabolischen und Entwicklungsprozessen zur Unterstützung der osmotischen Stressresistenz bei reduzierter Wasserverfügbarkeit (Zeevaart & Creelman, 1988; Tuteja, 2007). Unter diesen Stressbedingungen hat es in der Pflanze, insbesondere im Spross, eine wachstumsfördernde Wirkung (Sharp *et al.*, 1994; LeNoble *et al.*, 2004).

Die Beobachtung, dass die *PSKR1*-Signalwirkung die osmotische Stressresistenz im Spross reguliert, wurde dadurch untermauert, dass *PSKR1* stärker als *PSKR2* im Spross exprimiert wird. Die Promotoraktivität von *PSKR1*, jedoch nicht von *PSKR2*, war bei osmotischem Stress, induziert durch Mannitol, insbesondere in jungem Sprossgewebe erhöht. Diese Aktivität beschränkte sich bei anhaltendem osmotischem Stress während des Wachstums weiterhin auf die jungen teilungsaktiven Sprossgewebe. In anderen Spezies wurde bereits eine zellteilungsfördernde Wirkung von PSK beschrieben (Matsubayashi & Sakagami, 1996; Eun *et al.*, 2003; Grzebelus *et al.*, 2012; Kiełkowska & Adamus, 2018), für *Arabidopsis* gibt es ebenfalls Hinweise, dass nicht nur die Zellelongation sondern auch die -teilung durch den PSK-Signalweg reguliert wird (Hartmann *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2018). Expressionsanalysen zeigten, dass *PSKR1* sowohl durch osmotischen Stress als auch durch ABA induziert wird. Durch osmotischen Stress und ABA wurden, zusätzlich zu *PSKR1*, auch die *PSK*-Vorläufergene reguliert. *PSK3* wies, wie der Rezeptor, ein erhöhtes Transkriptniveau in Antwort auf Mannitol und ABA auf. Es scheint daher, dass der PSK-Signalweg durch osmotischen Stress durch ABA verstärkt aktiviert wird, um das Sprosswachstum aktiv zu erhalten. Die restlichen untersuchten *PSK*-Vorläufergene wurden durch Mannitol und ABA teilweise in übereinstimmender oder differentieller Weise reguliert. Dies deutet darauf hin, dass hinter der *PSKR1*-vermittelten Antwort auf osmotischen Stress und ABA ein komplexes Regulationsnetzwerk und kein linearer Signalweg steht. Die Expression von *PSK2* und *PSK4* wurde durch ABA, jedoch nicht durch Mannitol, induziert. Dies deutet auf eine Regulation des PSK-Signalweges durch ABA unabhängig von mannitolinduziertem osmotischem Stress hin. Auch die Hyperinduktion von *PSK1* und *PSK3* (und *PSK5*) durch Mannitol in *pskr1-3 psk2-1* verglichen mit dem Wildtyp weist auf eine komplexe Regulation hin und lässt vermuten, dass die PSK-Signalantwort die Expression von *PSK*-Vorläufergenen unter osmotischem Stress inhibiert, um das Wachstum differentiell an die wasserlimitierten Bedingungen anzupassen. Diese Arbeit erweitert das bekannte Interaktionsspektrum des PSK-Signalweges mit den Phytohormonen Auxin (Matsubayashi *et al.*, 1999a; Eun *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2018b), Brassinosteroiden (Hartmann *et al.*, 2013; Heyman *et al.*, 2013; Holzward *et al.*, 2018a; Holzward *et al.*, 2018b), Cytokinin (Matsubayashi *et al.*, 1999a; Brenner *et al.*, 2005) und Ethylen (Wu *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018b) um ABA.

4.3 PSKR-Signalwirkung reguliert den ABA-Metabolismus im Spross unter osmotischem Stress

Die ABA-Konzentration in der Pflanze wird durch *de novo* Synthese, Katabolismus, Inaktivierung und (Re-)Aktivierung reguliert (Nambara & Marion-Poll, 2005; Finkelstein, 2013). Eine durch osmotischen Stress hervorgerufene Erhöhung der ABA-Konzentration im Spross konnte bei Abwesenheit der PSK-Rezeptoren nicht nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass der ABA-Metabolismus von der PSKR-Signalwirkung abhängig ist.

Die Synthese des ABA-Vorläufers Xanthoxin durch NCEDs gilt als zentraler Schritt in der ABA-Synthese. NCED3 ist das Schlüsselenzym für diesen Prozess in der Stressantwort, unterstützt durch NCED5 (Iuchi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003; Frey *et al.*, 2012). NCED9 wird durch den PSK-Signalweg reguliert. NCED3 war im untersuchten Gewebe am stärksten exprimiert, NCED5 schwächer und NCED9 kaum. NCED3 wurde durch Mannitol induziert, NCED5 durch ABA, NCED9 zeigte keine Veränderungen. In *pskr1-3 pskr2-1* unterschied sich die Expression kaum. Eine tendenziell erhöhte Expression von NCED3 in der Mutante in Antwort auf Mannitol und eine ebenfalls tendenziell erhöhte Grundaktivität von NCED5 deuten auf eine erhöhte ABA-Synthese hin, die jedoch in der Mutante nicht nachvollzogen werden konnte.

Die vier Mitglieder der CYP707A-Familie katalysieren die irreversible Umwandlung und dadurch Inaktivierung von ABA zu PA und DPA (Kushiro *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004). CYP707A1, -2 und -4 wurden durch ABA induziert, CYP707A3 blieb in seiner Expression unverändert. CYP707A1 zeigte in der Rezeptornullmutante eine erhöhte Expression unter Kontrollbedingungen, die sich in Antwort auf ABA erhöhte, jedoch im Verhältnis nicht zur Induktion im Wildtyp unterschied. CYP707A2 und -4 waren in der Mutante in ihrer Expression leicht reduziert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der ABA-Abbau in der Rezeptormutante teilweise differentiell reguliert wird. Da es bei Abwesenheit der PSK-Perzeption sowohl Hinweise auf eine erhöhte Synthese als auch Abbau von ABA gab, könnte dies auf einen erhöhten Umsatz von ABA in *pskr1-3 pskr2-1* im Vergleich zum Wildtyp hindeuten. Dies kann jedoch nicht erklären, dass in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter Kontrollbedingungen kein Unterschied in der ABA-Konzentration vorhanden war und diese bei osmotischem Stress in der Mutante nicht zunahm.

Statt einer reduzierten Synthese oder eines erhöhten Abbaus von ABA in der Rezeptornullmutante könnte eine erhöhte Inaktivierung durch ABA-Glykosylierung oder eine inhibierte Freisetzung von ABA aus ABA-GE die reduzierte ABA-Konzentration in der Rezeptordoppelmutante erklären. Durch Bindung von Glucose an ABA durch die Aktivität von UGT71B6, -B7 und -B8 kommt es zu einer Reduzierung freien ABAs in Arabidopsis (Dong *et al.*, 2014). UGT71B7 war in jungen Sprossgeweben am stärksten exprimiert, UGT71B6 schwach und UGT71B8 kaum. UGT71B6 wurde durch Mannitol induziert, in der Mutante war diese Aktivität hyperinduziert. UGT71B7 wurde sowohl durch osmotischen Stress als auch durch ABA leicht in seiner Expression induziert. Die Mutante unterschied sich diesbezüglich nicht vom Wildtyp. UGT71B8 zeigte keinerlei veränderte Expression im Wildtyp und der Mutante. Nicht untersucht wurde das vierte bekannte ABA-GE-formende

Enzym UGT71C5, das ebenfalls eine zentrale Rolle bei der temporären Inaktivierung von ABA übernimmt (Liu *et al.*, 2015c). Die fehlende ABA-Verfügbarkeit in der Rezeptornullmutante könnte demnach das Resultat einer vermehrten Bindung freien ABAs an Glucose durch die Aktivität von UGT71B6 sein.

Die β -Glucosidasen BG1 und BG2 remobilisieren ABA aus ABA-GE-Speichern und sind Schlüsselregulatoren der osmotischen Stressresistenz (Lee *et al.*, 2006a; Xu *et al.*, 2012). *BG1* und *BG2* wurden durch ABA induziert. In der Rezeptornullmutante wurde die Expression von *BG1* bei osmotischem Stress inhibiert. Dies könnte, zusätzlich zu einer verstärkten Glykosylierung von ABA, ein Hinweis auf eine unterdrückte Freisetzung von ABA aus ABA-GE in der Mutante sein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der PSKR-Signalweg bei osmotischem Stress die Bindung von Glucose an ABA verhindert und die Freisetzung von ABA aus ABA-GE fördert (Abbildung 58). Diese Signalweginteraktion findet auf Grundlage einer Antwortschleife statt. Die Verfügbarkeit von ABA wird in diesem Falle nicht durch eine *de novo* Synthese oder den Abbau von ABA reguliert.

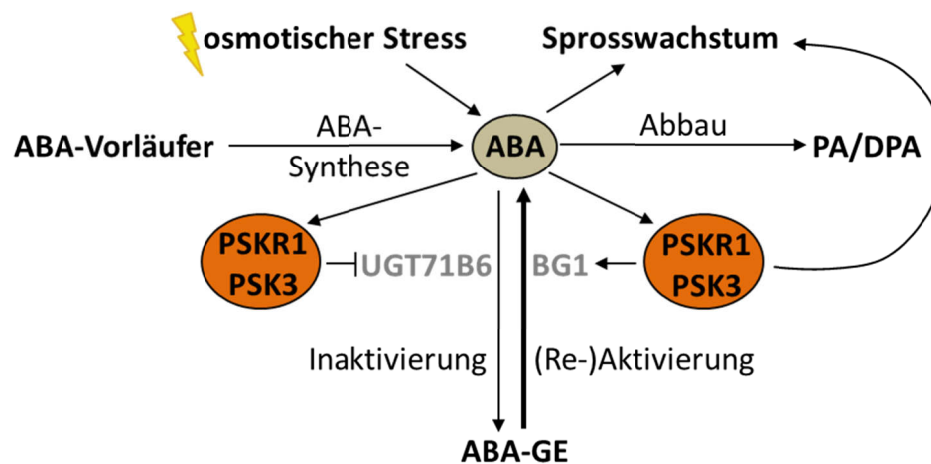


Abbildung 58: Der PSK-Signalweg trägt zum Erhalt aktiven ABAs im Spross bei und unterstützt die osmotische Stressresistenz.

ABA wird aus ABA-Vorläufern synthetisiert und zu PA und DPA abgebaut. Bei einer Inaktivierung wird es zu einem ABA-Glykosylester (ABA-GE) umgeformt und kann durch Hydrolyse (re-)aktiviert werden. Der ABA-Signalweg wird durch osmotischen Stress angeregt und induziert die Expression von *PSKR1* und *PSK3*. Der PSKR-Signalweg inhibiert die Inaktivierung und induziert die Reaktivierung von ABA und trägt zu einer Erhaltung aktiven ABAs und somit zu einer Resistenz gegen osmotischen Stress durch einen Erhalt des Wachstums bei.

Eine Regulation des ABA-Metabolismus ist bereits für ein anderes Peptidhormon beschrieben. CLE25 (CLAVATA3/ESR-RELATED 25) agiert als mobiles Signal in der Pflanze, induziert die *NCED3*-Expression, erhöht dadurch die Synthese von ABA und unterstützt den Stomaschluss (Takahashi *et al.*, 2018). Für PSK wurde bisher gezeigt, dass es nicht-zellautonom agiert (Hartmann *et al.*, 2013). Ein Langstreckentransport von PSK wäre theoretisch auch nicht nötig, dass die PSK-Vorläufergene ubiquitär exprimiert werden (Kutschmar *et al.*, 2009; Stührwohldt *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2017). Wie das Stresssignal in diesem Falle von der Wurzel, als erstem Perzeptionsort, in den Spross gelangt, bleibt zu klären. Bei einem Wasserdefizit wurden für eine Langstreckenkommunikation sowohl chemische und hydraulische als auch elektrische Signale beschrieben (Chazen & Neumann,

1994; Gil *et al.*, 2008; Schachtmann & Goodger, 2008). ABA selbst könnte als Regulator auftreten, da ein Transport des Hormons durch den Kormus nachgewiesen ist (Hartung *et al.*, 2002). Zumindest eine Regulation des PSK-/ABA-Signalweges über ein hydraulisches Signal scheint unwahrscheinlich, da durch dieses die Produktion von ABA über NCEDs angeregt wird (Qin & Zeevaart, 1999; Christmann *et al.*, 2008).

Zusätzlich zu einer Regulation von ABA-Metabolismusgenen war in der Rezeptormutante auffällig, dass die Expression des ABA-Rezeptorgens *PYL6* (Ma *et al.*, 2009; Aleman *et al.*, 2016) und des die ABA-unabhängige Stressantwort regulierenden TF-Gens *DREB2A* (Yoshida *et al.*, 2014), insbesondere in Antwort auf Mannitol, induziert war. Dies könnte zum einen auf einen Ausgleich des reduzierten ABA-Gehalts mit einer Erhöhung an Rezeptorbindestellen hindeuten und zum anderen, darauf dass in der Mutante auf den osmotischen Stress eine alternative Stressreaktion über einen ABA-unabhängigen Signalweg induziert wird. *DREB2A* induziert zum einen die Expression von Stressantwortgenen, führt jedoch auf der anderen Seite zu einer Wachstumsinhibition (Qin *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Die Induktion der Expression des TFs könnte somit Grund für die verstärkte Wachstumsinhibition der Rezeptormutante bei osmotischem Stress sein beziehungsweise eine Repression durch den PSK-Signalweg den Wachstumserhalt im Wildtyp erklären.

4.4 PSKR-Signalweg beeinflusst weitere ABA-abhängige und durch osmotischen Stress beeinflusste Entwicklungsprozesse

Nach der Keimung wird in Antwort auf ABA das Ergrünen der Kotyledonen inhibiert und somit der Übergang zur photoautotrophen Lebensweise der Pflanze unterdrückt (Kusnetsov *et al.*, 1998). Grundsätzlich inhibiert ABA die Transkription eines Großteils der Chloroplastengene (Yamburenko *et al.*, 2013; Yamburenko *et al.*, 2015). Nach der Keimung unter osmotischem Stress trug der PSKR-Signalweg zur Inhibierung des Ergrüens der Keimlinge bei. Die Rezeptornullmutante *pskr1-3 pskr2-1* zeigte bei Stress und in Antwort auf ABA ein verfrühtes Ergrünen der Kotyledonen, wohingegen *PSKR1*-überexprimierende Linien ein verzögertes Ergrünen im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Diese Reaktion der Überexpressionslinien wurde in Antwort auf exogenes PSK verstärkt. Das Peptidhormon allein hatte jedoch keinen Einfluss auf den Ergrünungszeitpunkt. Generell scheinen sulfatierte Peptide, oder das Fehlen dieser, die Expression von Genen zu beeinflussen, die die Photosynthese regulieren (Kang *et al.*, 2014). Die PSKR-vermittelte Inhibierung des Ergrüens in Antwort auf osmotischen Stress wurde, wie die Unterstützung des Sprosswachstums, durch *PSKR1* vermittelt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch im jungen Spross die Antwort der Pflanze durch eine Antwortschleife des ABA- und PSKR-Signalweges, resultierend in einer erhöhten Produktion von ABA, reguliert wird.

Die Wurzelverzweigung, die den Zugang zu Nährstoffen und Wasser beeinflusst, wird durch Stickstoff und Phosphat sowie durch die Interaktion der Auxin-, Cytokinin- und ABA-Signalwege reguliert (Brady *et al.*, 2003; Shkolnik-Inbar & Bar-Zvi, 2010; Finkelstein, 2013). Die genaue Wirkung von ABA in unterschiedlichen Abschnitten der

Lateralwurzelentwicklung ist noch nicht aufgeklärt (De Smet *et al.*, 2003; Nibau *et al.*, 2008; Harris, 2015). Mutantenanalysen geben konträre Hinweise auf eine ABA-abhängige Induktion oder Inhibition der Bildung von Lateralwurzelprimordien (Nibau *et al.*, 2008; Harris, 2015). Nach der Penetration der Epidermis kann ABA die Aktivierung des Lateralwurzelmeristems reprimieren und dadurch das weitere Wachstum der Lateralwurzeln unterbinden (De Smet *et al.*, 2003). Unter osmotischem Stress zeigt sich ein verringertes Lateralwurzelwachstum (Bouteillé, 2011; Duan *et al.*, 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der PSKR-Signalweg die Bildung von Lateralwurzelprimordien und sich daraus entwickelnden Lateralwurzeln begünstigt. Hinweise hierauf wurden bereits durch Kutschmar *et al.* (2009) beschrieben, die eine schwach, aber nicht signifikant reduzierte Anzahl Lateralwurzeln in *pskr1-3* im Vergleich zum Wildtyp beschrieben. In Antwort auf osmotischen Stress blieb die Anzahl der lateralen Wurzelorgane, die Summe aus Primordien und Lateralwurzeln, in der Rezeptornullmutante und *PSKR1*-Überexpressionslinien unverändert. Im Wildtyp war eine leicht erhöhte Anzahl zu beobachten. Bei einer getrennten Betrachtung der Anzahl von Primordien und ausgewachsenen Lateralwurzeln blieb die Anzahl an Primordien im Wildtyp unter Stress unverändert und die der Lateralwurzeln war erhöht. Bei osmotischem Stress war die Anzahl an Lateralwurzelprimordien in *pskr1-3 pskr2-1* erhöht und die der ausgewachsenen Lateralwurzeln verringert. Der gegenteilige Phänotyp war in den Überexpressionslinien zu beobachten. Die Beobachtungen im Wildtyp werden einerseits durch Beschreibungen von van der Weele *et al.* (2000), Deak & Malamy (2005), Xiong *et al.* (2006b) und Ding *et al.* (2015b) gestützt, die ein Gleichbleiben der Primordienanzahl bei osmotischem Stress beobachteten, stehen jedoch auch im Gegensatz dazu, da zusätzlich eine Abnahme an Lateralwurzeln gezeigt wurde. Dies ist möglicherweise auf unterschiedlich gewählte Anzuchtmethoden und untersuchte Entwicklungszeitfenster zurückzuführen. In dem hier gewählten Versuchsaufbau kam es durch den PSKR-Signalweg zu einem vermehrten Auswachsen von Lateralwurzeln bei osmotischem Stress. Dies sind Hinweise darauf, dass der PSK(R)-Signalweg nicht nur im Zellwachstum, sondern eventuell auch in der Regulation des Zellzyklus und der Zellteilung bei der Bildung von Lateralwurzelprimordien wirkt und der Reduktion der Komplexität des Wurzelsystems unter osmotischem Stress entgegenwirkt. In Bezug auf die Lateralwurzelentwicklung könnte der PSK-Signalweg als Gegenspieler zum ABA-Signalweg fungieren. Da jedoch die genaue Wirkung von ABA auf die Lateralwurzelentwicklung bisher nicht aufgeklärt ist, wären auch Interaktionen mit anderen Hormonsignalwegen möglich. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass der ABA-Signalweg im Zusammenspiel mit Auxin das Lateralwurzelwachstum fördern kann (Zhao *et al.*, 2014) und dass der PSK-Signalweg die Auxinkonzentration in der Pflanze erhöht (Zhang *et al.*, 2018b). Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass sich die mögliche Interaktion des PSK- mit dem ABA-Signalweg im Vergleich zum Spross unterscheidet, da die grundlegende Konzentration von ABA in der Wurzel der PSK-Rezeptornullmutante geringer war als die des Wildtyps, jedoch in Antwort auf osmotischen Stress zunahm und nicht wie im Spross gleichblieb.

Die letzte Stufe der Entwicklung von Pflanzenorganen ist die Seneszenz. Die Expression von ABA-Biosynthesegenen und dadurch die ABA-Konzentration in der Pflanze

sind sowohl während der Alterungs- als auch der stressinduzierten Seneszenz erhöht (Lim *et al.*, 2007). Auch in *pskr1-3*-Keimlingen wurden Hinweise auf eine verfrühte Seneszenz in Antwort auf osmotischen Stress gefunden. PSKR1 verzögert einen Eintritt der Seneszenz der Blätter nach dem Übergang in die generative Phase (Matsubayashi *et al.*, 2006; Amano *et al.*, 2007). Zudem induziert ein Verlust aller sulfatierter Peptide in *tpst-1* eine verfrühte Seneszenz (Komori *et al.*, 2009). Durch ABA wird die Seneszenz ebenfalls vorangetrieben (Ueda & Kato, 1982; Zeevaart & Creelman, 1988; Yang *et al.*, 2003). Sollten in diesem Mechanismus der PSK- mit dem ABA-Signalweg verknüpft sein, wäre dies durch eine negative Regulation möglich und stünde im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Beobachtungen. Es ist zudem eine erhöhte Akkumulation von DREB2A bei Blattseneszenz beschrieben (Vainonen *et al.*, 2012), die wiederum mit der erhöhten Genaktivität in der Rezeptornullmutante in Antwort auf Mannitol übereinstimmen würde. Die genaue Funktion von DREB2A während der Seneszenz ist jedoch nicht bekannt.

Ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion des PSK- und ABA-Signalweges liegt in der Regulation der biotischen Stressantwort. Für beide Hormone sind sowohl Mechanismen beschrieben, die die Pathogenabwehr verstärken, als auch schwächen (Ton *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2011) (Anhang Tabelle 21, Seite 212). Die durch den PSK-Signalweg unterstützte Abwehr gegen nekrotrophe Pathogene wird überwiegend ebenfalls durch ABA unterstützt und eine reduzierte Abwehr gegen (hemi-)biotrophe Erreger wird sowohl durch den PSK- als auch den ABA-Signalweg vermittelt (Anhang Tabelle 21, Seite 212). Stomata sind ein natürlicher Eintrittsort für Pathogene. Für ABA wird angenommen, dass der Stomaschluss, der durch das Hormon induziert und erhalten wird, ein zentrales Regulationselement für die Pathogenabwehr ist (Leung & Giraudat, 1998; Lim *et al.*, 2015). Sowohl *PSKR1* als auch *PSK3* und *PSK4* sind in den Stomata exprimiert (Anhang Abbildung 72, Seite 212) und die PSK-Rezeptordoppelmutante weist einen reduzierten Stomaschluss in Antwort auf ABA auf (mündliche Mitteilung L. Carstens, AG Sauter). Der Stomaschluss könnte ein gemeinsamer Ort der Regulation des Wasserhaushaltes bei Austrocknung und in Antwort auf biotischen Stress sein.

Insgesamt ist denkbar, dass eine Entwicklungsrepression von Keimlingen, der Erhalt des vegetativen Wachstums von Pflanzen sowie die Bildung eines komplexen Wurzelsystems durch den PSK-Signalweg zusammen dazu beitragen, dass die Pflanze bestmöglich mit einer reduzierten Wasserverfügbarkeit umgehen kann.

4.5 Ethylen als möglicher Antagonist zu ABA-/PSK-regulierten Prozessen

Ethylen ist in Pflanzen an der Regulation unterschiedlicher Prozesse beteiligt. Einer der bekanntesten, den das gasförmige Hormon vorantreibt, ist die Fruchtreife (Burg & Burg, 1962; Liu *et al.*, 2015a). Es ist beschrieben, dass hierbei einerseits ABA die Expression von Ethylensynthesegenen induziert (Chernys & Zeevaart, 2000; Jiang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009b), jedoch andererseits eine Repression der NCED-Aktivität ebenfalls zu einer erhöhten

Ethylenproduktion führt (Sun *et al.*, 2012). Bereits in diesem Beispiel kann man die komplexe Interaktion des ABA- und Ethylensignalweges erkennen. Auch für den PSK-Signalweg ist bekannt, dass eine Interaktion mit dem Ethylensignalweg stattfindet. Der PSK-Signalweg reprimiert die Ethylenbiosynthese in Arabidopsis-Keimlingen und Tomatenblättern (Wu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018b). Zusätzlich wurden durch Microarrayanalysen die ethyleninduzierten und den Ethylensignalweg regulierenden ERF-TFs RAP2.3, ESE3 und ERF104 (Büttner & Singh, 1997; Ogawa *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2006b; Li *et al.*, 2008; Bethke *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Deslauriers *et al.*, 2015) identifiziert, die wiederum durch PSK in ihrer Expression in der Wurzel reprimiert werden. Die ERF-TFs ERF109, ERF114 und ERF115, die die Expression der PSK-Vorläufergene *PSK2* und *PSK5* in der Wurzel direkt aktivieren (Heyman *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2018), sind jedoch nicht ethyleninduziert (Winter *et al.*, 2007; Heyman *et al.*, 2013).

Ethylen reguliert ebenfalls die Prozesse, die in dieser Arbeit für den PSK-Signalweg beschrieben wurden und in denen es Hinweise auf eine ABA-Interaktion gibt. Für Ethylen ist eine wachstumsinhibierende Wirkung im Spross beschrieben, die durch eine Repression der Zellexpansion und -teilung verursacht wird (Dubois *et al.*, 2018). ABA inhibiert in der frühen Antwort auf osmotischen Stress im Spross das Wachstum und unterstützt es im weiteren Verlauf, abhängig von der wachstumsverstärkenden und -inhibierenden Wirkung von Ethylen und der Verfügbarkeit von Nährstoffen (Sharp *et al.*, 1994; Sharp, 2002; Sharp & LeNoble, 2002; LeNoble *et al.*, 2004). In gut gewässerten Pflanzen unterstützt ABA das Sprosswachstum entgegen der Wirkung von Ethylen (Hussain *et al.*, 2000; LeNoble *et al.*, 2004). Im Spross wurde die Interaktion des ABA- und PSK-Signalweges bestätigt. Der PSK-Signalweg fördert das Sprosswachstum sowohl bei gut gewässerten Pflanzen, durch Zellexpansion (Stührwohldt *et al.*, 2011), als auch bei osmotisch gestressten. In der Wurzel geschieht das durch PSK vermittelte Wachstum in der Epidermis (Hartmann *et al.*, 2013). Dies ist auch der Ort an dem das Wachstum durch Ethylen inhibiert wird (Vaseva *et al.*, 2018).

Ethylen aktiviert lichtsensitive Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen und unterstützt dadurch das Ergrünen der Kotyledonen (Alscher & Castelfranco, 1972; Zong *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2014). ABA reprimiert die Plastidenbiogenese durch Inhibierung der Transkription der durch Ethylen induzierten Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen (Kusnetsov *et al.*, 1998). Der Mechanismus des Ergrüens wird durch ein komplexes Kommunikationsnetzwerk reguliert. Es ist bekannt, dass zusätzlich zu Ethylen und ABA weitere Phytohormone wie Cytokinin, Brassinosteroid, Ethylen und Auxin involviert sind (Kusnetsov *et al.*, 1998; Beligni & Lamattina, 2000; Zhang *et al.*, 2006; Galpaz *et al.*, 2008; Kravtsov *et al.*, 2011; Cortleven & Schmölling, 2015; Melo *et al.*, 2016). In der PSK-Rezeptornullmutante war ein verfrühtes Ergrünen in Antwort auf ABA und osmotischen Stress zu beobachten. Die Ethylenproduktion ist in dieser Linie wahrscheinlich nicht reprimiert und könnte zu einem Ergrünen als Gegenspieler zum PSK-Signalweg beitragen. Um dies nachweisen zu können, wäre eine Bestimmung der Ethylenkonzentration in der Pflanze hilfreich.

Ethylen inhibiert die Initiation und das Wachstum von Lateralwurzeln durch Regulation des Auxintransportes (Negi *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2011). Für ABA ist eine Repression des Wachstums penetrierter Lateralwurzeln beschrieben, jedoch kein eindeutiges Ergebnis über eine Regulation der Initiation von Lateralwurzelpremordien beschrieben (De Smet *et al.*, 2003; Nibau *et al.*, 2008; Harris, 2015). Die verringerte Anzahl an Lateralwurzelpremordien und Lateralwurzeln in der Rezeptornullmutante unter Kontrollbedingungen wäre durch eine erhöhte Ethylenkonzentration in der Pflanze erklärbar. Da die genaue Funktion und das Zusammenspiel von ABA und Ethylen bezüglich der Lateralwurzelentwicklung bisher nicht bekannt sind, ist eine Deutung der Beobachtung, dass eine *PSKR1*-Überexpression zu einem vermehrten Auswachsen von Lateralwurzeln bei osmotischem Stress führt, schwierig.

4.6 PSK-Signalweg wirkt inhibierend auf die Expression von Transkriptionsfaktorgenen

Für den PSK-Signalweg sind direkte Interaktionen mit anderen Proteinen in einem *Nanocluster* an der Plasmamembran als stromabwärts wirkender Signalweg beschrieben (Ladwig *et al.*, 2015). Da durch den PSK-Signalweg unterschiedliche Prozesse reguliert werden (Sauter, 2015), die wahrscheinlich nicht ausschließlich durch das *Nanocluster* gesteuert werden, ist eine Weiterleitung des Signals in den Nukleus und eine dadurch hervorgerufene differentielle Genexpression denkbar. Bisher war letztgenannter Teil des PSK-Signalweges, also welche Zielgene und durch welche TFs diese reguliert werden, nicht untersucht. Microarrayanalysen zeigten, dass in der Wurzel elf TF-Gene durch PSK, gemeinsam mit anderen sulfatierten Peptiden, reguliert werden. Ausschließlich durch PSK werden weitere fünf TFs in ihrer Expression beeinflusst. Die Expression oben genannter TF-Gene wird durch PSK und andere sulfatierte Peptide überwiegend, bei 13 von 16, reprimiert.

Da PSK vor allem für seine wachstumsfördernde Wirkung bekannt ist, die verstärkt in der Wurzel untersucht wurde (Kutschmar *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2013; Ladwig *et al.*, 2015), könnte dies darauf hindeuten, dass der PSK-Signalweg TFs inhibiert, die wiederum Gene mit einer wachstumshemmenden Wirkung aktivieren. Insbesondere in Bezug auf die PSK-reprimierten ERF-TFs könnte dies in Übereinstimmung mit den vorigen Erläuterungen stehen, die besagen, dass die Ethylensynthese durch PSK reprimiert wird (Wu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018b). Eine Überexpression des PSK-reprimierten ERF-TF-Gens *RAP2.3* führte zu einer Repression des Wurzelwachstums, jedoch nicht der PSK-vermittelten Wurzelelongation. Es ist bereits beschrieben, dass ABA die *RAP2.3*-Expression induziert, welches wiederum eine erhöhte Sensitivität gegenüber ABA vermittelt, die sich negativ auf die Primärwurzelelongation auswirkt (Papdi *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2017). Inwiefern die Inhibierung der Expression durch PSK und die Aktivierung durch ABA in der Wurzel zusammenhängen ist zu klären. Die ERF-TFs ESE3 und ERF104 wurden bisher nicht in Wachstumsstudien analysiert.

Die übrigen PSK-reprimierten TFs hatten überwiegend keinen Effekt auf die PSK-vermittelte Wurzelelongation, zeigten jedoch teilweise induzierende oder reprimierende

Effekte auf das Wurzelwachstum. Für *GAZ*, *DOF1.2*, *NAC015*, *STZ*, *NAC031*, *HB24* und *PDF2* existieren keine Vergleichsdaten zu Wachstumsanalysen. Für *NAC068* ist bei einer konstitutiven Expression der membranungebundenen Form ein reduziertes Wachstum mit verkleinerten Organen mit reduzierter Zellanzahl und erhöhter Zellgröße beschrieben, bei einem *knockout* ein verlängertes Hypokotyl mit vergrößerten Zellen (Kim *et al.*, 2006). Dies würde damit übereinstimmen, dass *NA068* durch PSK reprimiert wird, was zu einem verstärkten Wachstum der Pflanze führt. Dies konnte nicht bestätigt werden, da für die Analysen nur die membrangebundene, inaktive Form verwendet werden konnte, die keinen Einfluss auf das Wachstum hatte. Bei einer Überexpression von *bHLH129* ist eine verstärkte Elongation der Primärwurzel beschrieben (Tian *et al.*, 2015). Für die *knockout*-Linie ist keine Veränderung des Phänotyps bezüglich der Wurzellänge bekannt (Tian *et al.*, 2015). Die Reduktion der Wurzellänge bei einer Überexpression wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet, jedoch ein verkleinerter Spross. Dies würde wiederum in Übereinstimmung mit der wachstumsfördernden Wirkung von PSK und einer Repression der *bHLH129*-Genexpression stehen. Zusätzlich wird der TF durch ABA in seiner Expression reprimiert (Tian *et al.*, 2015). Dies wurde in dieser Arbeit bestätigt und könnte ein Hinweis darauf sein, dass ABA und PSK gemeinsam die Expression des TFs regulieren. *WRKY48* reprimiert das Rosettenwachstum (Xing *et al.*, 2008), ein *knockout* des Gens hatte denselben Effekt auf das Wurzelwachstum. In diesem Fall scheint die Regulation des Wachstums durch den TF in Wurzel und Spross unterschiedlich. Bei einer linearen Verknüpfung des PSK-Signalwegs mit der *WRKY48*-Aktivität wäre die Repression des Sprosswachstums durch den TF erklärbar, jedoch nicht die Induktion des Wurzelwachstums. Bei Überexpression von *STZ* kann es zu einer Reduktion des Wachstums der Rosettenblätter kommen, die durch eine geringere Zellgröße bedingt ist (Sakamoto *et al.*, 2004; Rossel *et al.*, 2007; Munekage *et al.*, 2015). Bei *STZ*-reprimierenden Linien ist ebenfalls eine Wachstumsreduktion sichtbar (Sakamoto *et al.*, 2004; Rossel *et al.*, 2007). Hier könnte ebenfalls die Reduktion des Wachstums bei Überexpression durch einen linearen Zusammenhang mit dem PSK-Signalweg erklärt werden. Jedoch scheint *STZ* sowohl bei einer verstärkten als auch reduzierten Genaktivität ähnliche Effekte zu haben, was für den PSK-Signalweg bisher nicht beobachtet wurde.

Es wurde festgestellt, dass die PSK-regulierten TFs Entwicklungsprozesse und ebenso Stressantworten regulieren, wie es für den PSK-Signalweg beschrieben ist. Dies könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die TFs, je nach Reiz und Signalkette, unterschiedliche Prozesse regulieren. Die große Anzahl und Diversität an PSK-regulierten TFs, sowie deren unterschiedliche Wirkung auf das Wurzelwachstum bestätigt, dass hinter dem PSK-Signalweg ein komplexes Regulationsnetzwerk steht und eine lineare Regulation des PSK-abhängigen Primärwurzelwachstums unwahrscheinlich ist.

4.7 PSK-induzierte Transkriptionsfaktoren fördern das Wurzelwachstum

Der Effekt der überwiegend durch PSK reprimierten TFs auf das Primärwurzelwachstum war nicht einheitlich. Auffällig war hingegen, dass die drei PSK-induzierten TFs, AGL17, AGL21 und MYB88, das Wurzelwachstum durchweg unterstützten. Von AGL17 ist bisher keine Regulation des Wachstums beschrieben. Der TF unterstützt den Übergang in die generative Phase (Han *et al.*, 2008), was in dieser Arbeit ebenfalls für AGL21 beobachtet werden konnte. Für AGL21 wurde eine Regulation der Primärwurzelelongation bisher nicht beobachtet (Yu *et al.*, 2014). Es gibt jedoch Hinweise auf eine Interaktion von AGL21 mit SIEL (SHORT-ROOT INTERACTING EMBRYONIC LETHAL), einem TF-Transportprotein (Koizumi *et al.*, 2011). Ein *knockout* dieses Gens führt zu einer stark verkürzten Wurzel und einer veränderten Kortexschicht innerhalb dieser (Koizumi *et al.*, 2011), vergleichbar mit dem Phänotyp der *tpst-1*-Mutante (M. Sauter, Daten unveröffentlicht). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der durch AGL21 regulierte Signalweg abhängig von PSK oder anderen sulfatierten Peptiden ist. Ein gemeinsamer *knockout* von AGL17 und AGL21 bewirkte keinen additiven Effekt bei der Induktion des Wurzelwachstums. Die beiden Gene scheinen demnach nicht redundant zu wirken. Bereits durch Burgeff *et al.* (2002) wurde gezeigt, dass AGL17 und AGL21 unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen und stattdessen eine mögliche Redundanz oder Interaktion mit AGL16 (*AGAMOUS-like 16*) und ANR1 (*ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1*) besteht (Burgeff *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2005). Hinweise auf eine positive Regulation der Zellelongation im Hypokotyl durch MYB88 im Zusammenhang mit Xyloglucanen bestanden bereits (Xu *et al.*, 2017). Hier wurde zusätzlich gezeigt, dass MYB88 das Wurzelwachstum verstärkt. Es könnte also sein, dass der PSK-Signalweg die Zellelongation im Zusammenspiel mit zellwandremodellierenden Enzymen reguliert.

Die Überexpressions- sowie *knockout*-Linien der PSK-induzierten TFs zeigten ein durch PSK verstärktes Wachstum. Folglich reguliert keiner der untersuchten TFs das PSK-vermittelte Wurzelwachstum als alleiniger Schlüsselfaktor und ihre wachstumsfördernde Wirkung kann durch redundante Funktion anderer Genprodukte ersetzt werden. Auch hier ist eine Steuerung des PSK-vermittelten Wachstums sowohl durch direkte Interaktion von PSKR1 im Nanocluster und einem dadurch induzierten Wasserseinstrom als auch eine Signalweiterleitung in den Nukleus und eine veränderte Genexpression als Ursache denkbar.

4.8 Ausblick

Diese Arbeit zeigt zum einen, dass der PSK-Signalweg die osmotische Stressresistenz erhöht und zum anderen eine Interaktion des PSK-Signalweges mit dem ABA-Signalweg. Weitere Untersuchungen sind nötig um zu klären, ob die durch Mannitol und Sorbitol hervorgerufene verstärkte Wachstumsreduktion in der PSK-Rezeptornullmutante auf osmotischen Stress oder einen Nebeneffekt durch Aufnahme und Verstoffwechslung der

Zuckeralkohole (Munns, 2002) zurückzuführen ist. Eine Untersuchung des Wachstums der *knockout*- und Überexpressionslinien der PSK-Rezeptoren unter Trockenstressbedingungen auf Erde und polyethylenglycolhaltigem Medium könnten Aufschluss darüber geben, wobei jede der Untersuchungsmethoden ihre Vor- und Nachteile birgt (Osmolovskaya *et al.*, 2018). Im Zuge dieser Untersuchungen könnte ebenfalls aufgeklärt werden, ob die Wachstumsinhibierung durch eine Reduktion der Zellgröße und/oder eine verminderte Meristemaktivität verursacht wird.

Weiterhin könnten Versuche durchgeführt werden, um eine weitreichendere Übersicht über die Interaktion des ABA- und PSK-Signalweges in Reaktion auf osmotischen Stress und die Regulation der Signalweiterleitung in unterschiedlichen Geweben der Pflanze zu erlangen. Hierzu könnte eine mögliche PSK-signalwegabhängige Regulation des Stomaschlusses untersucht werden. Analog zu den im Spross durchgeführten Analysen könnte die Expressionsänderung von PSK-Vorläufer und PSKR-Genen in Antwort auf osmotischen Stress und ABA in der Wurzel untersucht werden, da sich bei einer Messung der ABA-Konzentration in diesem Organ bereits Unterschiede zum Spross zeigten.

Hinsichtlich der Untersuchung der PSK-Signalweiterleitung über die Aktivität von TFs ist bisher nur der Grundstein gelegt. Da es sich bei den untersuchten TFs ausschließlich um Faktoren handelt, die bei einer Langzeitbehandlung von fünf Tagen mit PSK reguliert waren, die TF-Aktivität jedoch meist als eine schnelle Antwort auf Stimuli innerhalb von Sekunden bis Stunden geschieht (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006; Fujita *et al.*, 2011; Swift & Coruzzi, 2017), sollte dieser Aspekt keinesfalls außer Acht gelassen werden. Die frühesten Signalwegregulationen durch TFs werden durch bereits vorhandene TF-Proteine ausgeführt. Diese sind durch einen Microarray nicht abbildbar. Die in dieser Arbeit vorgestellten TFs sind daher eher in die Regulation sekundärer Effekte des PSK-Stimulus oder eine stetige, indirekte Regulation durch das Hormon einzuordnen.

Zwischen der Bindung von PSK an die PSK-Rezeptoren und der Transkriptionsänderung liegen voraussichtlich viele noch unbekanntes Zwischenreaktionen. Mögliche Ansätze zur Untersuchung dieser wären zum einen die Identifizierung löslicher Proteine als temporäre Interaktionspartner der PSK-Rezeptoren und von diesen wiederum ausgehend Interaktionspartner um die Signalweiterleitung in den Nukleus Stück für Stück aufzuklären. Zum anderen könnte man in einem weiteren Microarray untersuchen, welche Gene in Reaktion auf PSK als schnelle Antwort differentiell reguliert werden und an deren Promotoren bindende TFs identifizieren.

5 Literatur

- Abbas, M., Berckhan, S., Rooney, D. J., Gibbs, D. J., Conde, J. V., Correia, C. S., ... Holdsworth, M. J. (2015). Oxygen sensing coordinates photomorphogenesis to facilitate seedling survival. *Current Biology*, *25*(11), 1483–1488.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003a). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, *15*, 63–78.
- Abe, M., Katsumata, H., Komeda, Y., Takahashi, T. (2003b). Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in Arabidopsis. *Development*, *130*, 635–643.
- Abel, S., Nguyen, M. D., Chow, W., Theologis, A. (1995). ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin [corrected]. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(32), 19093–19099.
- Achuo, E. A. & Höfte, M. (2006). Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology*, *55*(2), 178–186.
- Adcock, I. M. & Caramori, G. (2009). Asthma and COPD - Basic mechanisms and clinical management. *Elsevier, Amsterdam*.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C. H., Fujii, H., Zheng, X., Zhu, J. K. (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(49), 37636–37645.
- Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., van Arkel, G., Pereira, A. (2004). The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *16*, 2463–2480.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell*, *9*, 841–857.
- Aleman, F., Yazaki, J., Lee, M., Takahashi, Y., Kim, A. Y., Li, Z., ... Schroedera, J. I. (2016). An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 transcription factor: A putative link of ABA and JA signaling. *Scientific Reports*, *6*, 28941.
- Alonso, R., Onate-Sanchez, L., Weltmeier, F., Ehlert, A., Diaz, I., Dietrich, K., ... Droege-Laser, W. (2009). A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of Arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *Plant Cell*, *21*, 1747–1761.
- Alscher, R. G. & Castelfranco, P. A. (1972). Stimulation by ethylene of chlorophyll biosynthesis in dark-grown cucumber cotyledons. *Plant Physiology*, *50*, 400–403.
- Alvarez-Buylla, E. R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Chaos Cador, A., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., ... Sánchez-Corrales, Y. E. (2010). Flower development. *The Arabidopsis Book*, *8*, e0127.
- Amano, Y., Tsubouchi, H., Shinohara, H., Ogawa, M., Matsubayashi, Y. (2007). Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 18333–18338.

- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N. R., Yadav, R. C. (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: An overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(3), 307–321.
- Antoni, R., González-Guzmán, M., Rodriguez, L., Peirats-Llobet, M., Pizzio, G. A., Fernandez, M. A., ... Rodriguez, P. L. (2013). PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant Physiology*, 161, 931–941.
- Arteca, R. N. & Arteca, J. M. (2008). Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3019–3026.
- Bai, F. & Settles, A. M. (2015). Imprinting in plants as a mechanism to generate seed phenotypic diversity. *Frontiers in Plant Science*, 5, 780.
- Bai, L., Zhou, Y., Song, C.-P. (2009). Arabidopsis proline-rich extensin-like receptor kinase 4 modulates the early event toward abscisic acid response in root tip growth. *Plant Signaling & Behavior*, 4(11), 1075–1077.
- Bailey, P. C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P. H., Huq, E., Heim, M. A., ... Weisshaar, B. (2003). Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 15, 2497–2502.
- Bakshi, M. & Oelmüller, R. (2014). WRKY transcription factors: Jack of many trades in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 9, e27700.
- Balkunde, R., Kitagawa, M., Xu, X. M., Wang, J., Jackson, D. (2017). SHOOT MERISTEMLESS trafficking controls axillary meristem formation, meristem size and organ boundaries in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 90(3), 435–446.
- Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q. W., Chua, N. H. (2001). Overexpression of Arabidopsis *ESR1* induces initiation of shoot regeneration. *The Plant Cell*, 13, 2609–2618.
- Bäurle, I. & Laux, T. (2005). Regulation of *WUSCHEL* transcription in the stem cell niche of the Arabidopsis shoot meristem. *The Plant Cell*, 17(8), 2271–2280.
- Bedi, S., Sengupta, S., Ray, A., Chaudhuri, R. N. (2016). ABI3 mediates dehydration stress recovery response in *Arabidopsis thaliana* by regulating expression of downstream genes. *Plant Science*, 250, 125–140.
- Beligni, M. V. & Lamattina, L. (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210, 215–221.
- Belin, C., Megies, C., Hauserová, E., Lopez-Molina, L. (2009). Abscisic acid represses growth of the Arabidopsis embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *The Plant Cell*, 21(8), 2253–2268.
- Belles-Boix, E., Hamant, O., Witiak, S. M., Morin, H., Traas, J., Pautot, V. (2006). KNAT6: An Arabidopsis homeobox gene involved in meristem activity and organ separation. *The Plant Cell*, 18(8), 1900–1907.
- Bennett, T., van den Toorn, A., Sanchez-Perez, G. F., Campilho, A., Willemsen, V., Snel, B., Scheres, B. (2010). SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22, 640–654.
- Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., Huala, E. (2015). The Arabidopsis Information Resource: making and mining the “Gold Standard” annotated reference plant genome. *Genesis*, 53(8), 474–485.
- Bernhardt, C., Lee, M. M., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A., Schiefelbein, J. (2003). The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the Arabidopsis root. *Development*, 130(26), 6431–6439.

- Bernhardt, C., Zhao, M., Gonzalez, A., Lloyd, A., Schiefelbein, J. (2005). The bHLH genes *GL3* and *EGL3* participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the Arabidopsis root epidermis. *Development*, *132*, 291–298.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J. F., Pöschl, Y., Gust, A. A., Scheel, D., Lee, J. (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(19), 8067–8072.
- Bishop, G. J. & Koncz, C. (2002). Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *The Plant Cell*, *14*, S97–S110.
- Bittner, F., Oreb, M., Mendel, R. R. (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*, 40381–40384.
- Blein, T., Pulido, A., Vialette-Guiraud, A., Nikovics, K., Morin, H., Hay, A., ... Laufs, P. (2008). A conserved molecular framework for compound leaf development. *Science*, *322*(5909), 1835–1839.
- Blödner, C., Goebel, C., Feussner, I., Gatz, C., Polle, A. (2007). Warm and cold parental reproductive environments affect seed properties, fitness, and cold responsiveness in *Arabidopsis thaliana* progenies. *Plant, Cell and Environment*, *30*(2), 165–175.
- Bogeat-Triboulot, M. B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., ... Dreyer, E. (2007). Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology*, *143*(2), 876–892.
- Boratyn, G. M., Camacho, C., Cooper, P. S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., ... Zaretskaya, I. (2013). BLAST: A more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, *41*, Web Server issue.
- Boursiac, Y., Lérant, S., Corratgé-Faillie, c., Gojon, A., Krouk, G., Lacombe, B. (2013). ABA transport and transporters. *Trends in Plant Science*, *18*(6), 325–333.
- Bouteillé, M. (2011). Control of shoot and root growth by water deficit in *Arabidopsis thaliana*: a parallel analysis using artificial and natural mapping populations. *Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques, Montpellier*.
- Boyer, J. S. (1970). Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean and sunflower at various leaf water potential. *Plant Physiology*, *46*, 233–235.
- Brady, S. M., Sarkar, S. F., Bonetta, D., McCourt, P. (2003). The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (*ABI3*) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *34*(1), 67–75.
- Braidwood, L., Breuer, C., Sugimoto, K. (2014). My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist*, *201*(2), 388–402.
- Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Bürkle, L., Schmülling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, *44*(2), 314–333.
- Broun, P., Poindexter, P., Osborne, E., Jiang, C. Z., Riechmann, J. L. (2004). WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 4706–4711.
- Burg, A. P. & Burg, E. A. (1962). Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiology*, *37*(2), 179–189.

- Burgeff, C., Liljegren, S. J., Tapia-López, R., Yanofsky, M. F., Alvarez-Buylla, E. R. (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*, 214(3), 365–372.
- Burian, A., Raczyńska-Szajgin, M., Borowska-Wykręt, D., Piatek, A., Aida, M., Kwiatkowska, D. (2015). The *CUP-SHAPED COTYLEDON2* and 3 genes have a post-meristematic effect on *Arabidopsis thaliana* phyllotaxis. *Annals of Botany*, 11(5), 807–820.
- Busch, W. & Benfey, P. N. (2010). Information processing without brains - The power of intercellular regulators in plants. *Development*, 137, 1215–1226.
- Butenko, M. A., Patterson, S. E., Grini, P. E., Stenvik, G. E., Amundsen, S. S., Mandal, A., Aalen, R. B. (2003). Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *The Plant Cell*, 15(10), 2296–2307.
- Büttner, M. & Singh, K. B. (1997). *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5961–5966.
- Cai, S. & Lashbrook, C. C. (2008). Stamen abscission zone transcriptome profiling reveals new candidates for abscission control: enhanced retention of floral organs in transgenic plants overexpressing *Arabidopsis* ZINC FINGER PROTEIN2. *Plant Physiology*, 146(3), 1305–1321.
- Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H. M., Peng, J. (2006). Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142(2), 509–525.
- Cao, F., Yoshioka, K., Desveaux, D. (2011). The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research*, 124, 489–499.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., ... Bennett, M. J. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science*, 8(4), 165–171.
- Chaitanya, K. Y., Sundar, D., Jutur, P. P., Reddy, A. R. (2003). Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation*, 40(1), 75–80.
- Chan, R. L., Gago, G. M., Palena, C. M., Gonzalez, D. H. (1998). Homeoboxes in plant development. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1442(1), 1–19.
- Chartzoulakis, K., Noitsakis, B., Therios, I. (1993). Photosynthesis, plant growth and dry matter distribution in kiwifruit as influenced by water deficits. *Irrigation Science*, 14(1), 1–5.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), 239–264.
- Chazen, O. & Neumann, P. M. (1994). Hydraulic signals from the roots and rapid cell-wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficits. *Plant Physiology*, 104, 1385–1392.
- Che, P., Lall, S., Nettleton, D., Howell, S. H. (2006). Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiology*, 141(2), 620–637.
- Chen, J., Nolan, T. M., Ye, H., Zhang, M., Tong, H., Xin, P., Yin, Y. (2017). *Arabidopsis* WRKY46, WRKY54, and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses. *The Plant Cell*, 29(6), 1425–1439.

- Chen, Q., Liu, Y., Maere, S., Lee, E., van Isterdael, G., Xie, Z., ... Vanneste, S. (2015). A coherent transcriptional feed-forward motif model for mediating auxin-sensitive *PIN3* expression during lateral root development. *Nature Communications*, *6*, 8821.
- Chen, W., Chao, G., Singh, K. B. (1996). The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *The Plant Journal*, *10*(6), 955–966.
- Chen, Y. C., Wong, C. L., Muzzi, F., Vlaardingerbroek, I., Kidd, B. N., Schenk, P. M. (2014). Root defense analysis against *Fusarium oxysporum* reveals new regulators to confer resistance. *Scientific Reports*, *4*, 5584.
- Cheng, C.-Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., Town, C. D. (2017). Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *The Plant Journal*, *89*, 789–804.
- Cheng, W.-S., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.-C., Arroyo, A., ... Sheen, J. (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell*, *14*(11), 2723–2743.
- Chernys, J. T. & Zeevaart, J. A. (2000). Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology*, *124*, 343–353.
- Christmann, A., Grill, E., Huang, J. (2008). Hydraulic signals in long-distance signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*, 293–300.
- Claeys, H., Van Landeghem, S., Dubois, M., Maleux, K., Inzé, D. (2014). What is stress? Dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. *Plant Physiology*, *165*, 519–527.
- Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *16*(6), 735–743.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Tonelli, C. (2005). A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Current Biology*, *15*(13), 1196–1200.
- Cornforth, J. W., Milborrow, B. V., Ryback, G., Wareing, P. F. (1965). Chemistry and physiology of 'dormins' in sycamore: identity of sycamore 'dormin' with abscisic acid. *Nature*, *205*, 1269–1270.
- Cornforth, J. W., Milborrow, B. V., Ryback, G., Wareing, P. F. (1966). Isolation of sycamore dormin and its identity with abscisic acid. *Tetrahedron*, *22*, 603–610.
- Cortleven, A. & Schmülling, T. (2015). Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, *66*, 4999–5013.
- Cosgrove, D. J. (2014). Plant Cell Growth and Elongation. *eLS. John Wiley & Sons, Chichester*, 10.1002/9780470015902.a0001688.pub2.
- Costa França, M. G., Pham Thi, A. T., Pimentel, C., Pereyra Rossiello, R. O., Zuily-Fodil, Y., Laffray, D. (2000). Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Biology*, *43*(3), 227–237.
- Cui, H. C., Levesque, M. P., Vernoux, T., Jung, J. W., Paquette, A. J., Gallagher, K. L., ... Benfey, P. N. (2007). An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science*, *316*, 421–425.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 651–679.

- Czechowski, T., Bari, R. P., Stitt, M., Scheible, W. R., Udvardi, M. K. (2004). Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal*, 38(2), 366–379.
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H., Sommer, H. (1996). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *The EMBO Journal*, 15, 4330–4343.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D. J., Coutu, J., ... Mittler, R. (2005a). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17, 268–281.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., Mittler, R. (2005b). The zinc-finger protein ZAT12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139, 847–856.
- De Folter, S., Immink, R. G. H., Kieffer, M., Pařenicová, L., Henz, S. R., Weigel, D., ... Angenent, G. C. (2005). Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS box transcription factors. *The Plant Cell*, 17(5), 1424–1433.
- de Oliveira, A. B., Alencar, N. L. M., Gomes-Filho, E. (2013). Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development - Responses of organisms to water stress. *IntechOpen, London*, 67-94.
- De Paepe, A., Vuylsteke, M., Van Hummelen, P., Zabeau, M., Van Der Straeten, D. (2004). Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 39(4), 537–559.
- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inzé, D., Foyer, C. H., Zhang, H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 33(3), 543–555.
- de Torres Zabala, M., Bennett, M. H., Truman, W. H., Grant, M. R. (2009). Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *The Plant Journal*, 59, 375–386.
- Deak, K. I. & Malamy, J. (2005). Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal*, 43, 17–28.
- Delessert, C., Kazan, K., Wilson, I. W., van der Straeten, D., Manners, J., Dennis, E. S., Dolferus, R. (2005). The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 43(5), 745–757.
- Delmas, F., Sankaranarayanan, S., Deb, S., Widdup, E., Bournonville, C., Bollier, N., ... Samuel, M. A. (2013). ABI3 controls embryo degreening through Mendel's I locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, E3888–E3894.
- Deslauriers, S. D., Alvarez, A. A., Lacey, R. F., Binder, B. M., Larsen, P. B. (2015). Dominant gain-of-function mutations in transmembrane domain III of ERS1 and ETR1 suggest a novel role for this domain in regulating the magnitude of ethylene response in Arabidopsis. *New Phytologist*, 208, 442–455.
- Di, X., Takken, F. L. W., Tintor, N. (2016). How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 170.
- Dias, A. P., Braun, E. L., McMullen, M. D., Grotewold, E. (2003). Recently duplicated maize *R2R3 Myb* genes provide evidence for distinct mechanisms of evolutionary divergence after duplication. *Plant Physiology*, 131, 610–620.

- Dietz, K.-J., Sauter, A., Wichert, K., Messdaghi, D., Hartung, W. (2000). Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany*, 51(346), 937–944.
- Ding, Y., Li, H., Zhang, X., Xie, Q., Gong, Z., Yang, S. (2015a). OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 9(32), 278–289.
- Ding, Z. J., Yan, J. Y., Li, C. X., Li, G. X., Wu, Y. R., Zheng, S. J. (2015b). Transcription factor WRKY46 modulates the development of Arabidopsis lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis. *The Plant Journal*, 84(1), 56–69.
- Djordjevic, M. A., Oakes, M., Wong, C. E., Singh, M., Bhalla, P., Kusumawati, L., Imin, N. (2011). Border sequences of *Medicago truncatula* CLE36 are specifically cleaved by endoproteases common to the extracellular fluids of *Medicago* and soybean. *Journal of Experimental Botany*, 62, 4649–4659.
- Dong, C.-H., Rivarola, M., Resnick, J. S., Maggin, B. D., Chang, C. (2008). Subcellular co-localization of Arabidopsis RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signaling. *The Plant Journal*, 53(2), 275–286.
- Dong, C. H., Jang, M., Scharein, B., Malach, A., Rivarola, M., Liesch, J., ... Chang, C. (2010). Molecular association of the Arabidopsis ETR1 ethylene receptor and a regulator of ethylene signaling, RTE1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40706–40713.
- Dong, T., Xu, Z.-Y., Park, Y., Kim, D. H., Lee, Y., Hwang, I. (2014). Abscisic acid uridine diphosphate glucosyltransferases play a crucial role in abscisic acid homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(1), 277–289.
- Duan, L., Dietrich, S., Ng, C. H., Chan, P. M., Bhalerao, R., Bennett, M. J., Dinneny, J. R. (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell*, 25(1), 324–341.
- Dubois, M., Skirycz, A., Claeys, H., Maleux, K., Dhondt, S., De Bodt, S., ... Inzé, D. (2013). ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 acts as a central regulator of leaf growth under water-limiting conditions in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 162(1), 319–332.
- Dubois, M., Van den Broeck, L., Inzé, D. (2018). The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in Plant Science*, 23(4), 311–323.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15, 573–581.
- Englbrecht, C. C., Schoof, H., Böhm, S. (2004). Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics*, 5(4), 39.
- Erice, G., Louahlia, S., Irigoyen, J. J., Sanchez-Diaz, M., Avice, J. C. (2010). Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of Plant Physiology*, 167(2), 114–120.
- Ernst, H. A., Olsen, A. N., Larsen, S., Lo Leggio, L. (2004). Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Reports*, 5(3), 297–303.
- Espinosa-Ruiz, A., Martínez, C., de Lucas, M., Fàbregas, N., Bosch, N., Caño-Delgado, A., Prat, S. (2017). TOPLESS mediates brassinosteroid control of shoot boundaries and root meristem development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 144(9), 1619–1628.

- Etchells, J. P., Provost, C. M., Turner, S. R. (2012). Plant vascular cell division is maintained by an interaction between PXY and ethylene signalling. *PLOS Genetics*, 8(11), e1002997.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5, 199–206.
- Eulgem, T. & Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 366–371.
- Eun, C.-H., Ko, S.-M., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H. (2003). Phytosulfokine- α requires auxin to stimulate carrot non-embryogenic cell proliferation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(5), 447–452.
- Fairman, R., Beran-Steed, R. K., Anthony-Cahill, S. J., Lear, J. D., Stafford, W. F. I., DeGrado, W. F., ... Brenner, S. L. (1993). Multiple oligomeric states regulate the DNA binding of helix-loop-helix peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), 10429–10433.
- Fan, J., Hill, L., Crooks, C., Doerner, P., Lamb, C. (2009). Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiology*, 150(4), 1750–1761.
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E. L., Grotewold, E. (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal*, 66(1), 94–116.
- Feng, G., Qin, Z., Yan, J., Zhang, X., Hu, Y. (2011). Arabidopsis *ORGAN SIZE RELATED1* regulates organ growth and final organ size in orchestration with *ARGOS* and *ARL*. *New Phytologist*, 191(3), 635–646.
- Fernando, V. C. D. & Schroeder, D. F. (2016). Role of ABA in Arabidopsis salt, drought, and desiccation tolerance - Abiotic and biotic stress in Plants - Recent advances and future perspectives. *IntechOpen, London*, Kapitel 22.
- Ferre-D'Amare, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G., Burley, S. K. (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *The EMBO Journal*, 13, 180–189.
- Ferreira, F. J., Guo, C., Coleman, J. R. (2008). Reduction of plastid-localized carbonic anhydrase activity results in reduced Arabidopsis seedling survivorship. *Plant Physiology*, 147(2), 585–594.
- Finkelstein, P. R. (2013). Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*, 11, e0166.
- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R., Meyerowitz, E. M. (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science*, 283, 1911–1914.
- French, R. J. & Turner, N. C. (1991). Water deficits change dry matter partitioning and seed yield in narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 42, 471–484.
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., ... Marion-Poll, A. (2012). Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *The Plant Journal*, 70, 501–512.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., ... Shinozaki, K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal*, 39(6), 863–876.

- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124(4), 509–525.
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T. S., Laloi, C., Minkov, I. N., Shulaev, V., ... van Breusegem, F. (2006). Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 141, 436–445.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D., Hirschberg, J. (2008). Abscisic acid deficiency in the tomato mutant *high-pigment 3* leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *The Plant Journal*, 53, 717–730.
- Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., Forde, B. G. (2005). Nutritional regulation of *ANR1* and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 222(4), 730–742.
- Gao, X., Chen, X., Lin, W., Chen, S., Lu, D., Niu, Y., ... He, P. (2013). Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca^{2+} -dependent protein kinases. *PLOS Pathogens*, 9(1), e1003127.
- Gao, X. & He, P. (2013). Nuclear dynamics of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases in effector-triggered immunity. *Plant Signaling & Behavior*, 8(4), e23868.
- Gasch, P., Fundinger, M., Müller, J. T., Lee, T., Bailey-Serres, J., Mustroph, A. (2016). Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(1), 160–180.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., Bairoch, A. (2003). ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784–3788.
- Gehring, M., Missirian, V., Henikoff, S. (2011). Genomic analysis of parent-of-origin allelic expression in *Arabidopsis thaliana* seeds. *PLOS ONE*, 6, e23687.
- Gehring, W. J. (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science*, 236(4806), 1245–1252.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., ... Hedrich, R. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca^{2+} affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), 8023–8028.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., ... Hedrich, R. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21425–21430.
- Geilen, K., Heilmann, M., Hillmer, S., Böhmer, M. (2017). WRKY43 regulates polyunsaturated fatty acid content and seed germination under unfavourable growth conditions. *Scientific Reports*, 7, 14235.
- Geisler, M., Nadeau, J., Sack, F. D. (2000). Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in Arabidopsis are disrupted by the *too many mouths* mutation. *The Plant Cell*, 12, 2075–2086.
- Gibbs, D. J., Lee, S. C., Isa, N. M., Gramuglia, S., Fukao, T., Bassel, G. W., ... Holdsworth, M. J. (2011). Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature*, 479, 415–418.
- Gibbs, D. J., Md Isa, N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G. M., Berckhan, S., ... Holdsworth, M. J. (2014). Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Molecular Cell*, 53(3), 369–379.

- Gil, P. M., Gurovich, B., Schaffer, B., Alcayaga, J., Rey, S., Iturriaga, R. (2008). Root to leaf electrical signaling in avocado in response to light and soil water content. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1070–1078.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., ... Shimada, Y. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *The Plant Journal*, 55(3), 526–542.
- Goldsmith, M. H. M. (1977). The polar transport of auxin. *Annual Review of Plant Physiology*, 28, 439–478.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J.-P., ... Rochange, S. F. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455, 189–194.
- Gonçalves, B., Hasson, A., Belcram, K., Cortizo, M., Morin, H., Nikovics, K., ... Arnaud, N. (2015). A conserved role for *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes during ovule development. *The Plant Journal*, 83(4), 732–742.
- Gong, Z., Koiwa, H., Cushman, M. A., Ray, A., Bufford, D., Kore-eda, S., ... Hasegawa, P. M. (2001). Genes that are uniquely stress regulated in Salt Overly Sensitive (*sos*) mutants. *Plant Physiology*, 126(1), 363–375.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R., ... Rodríguez, P. L. (2002). The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell*, 14, 1833–1846.
- Gonzalez, D. H. (2015). Plant transcription factors: evolutionary, structural and functional aspects. *Academic Press, London*.
- Goto, K. & Meyerowitz, E. M. (1994). Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes & Development*, 8, 1548–1560.
- Govrin, E. M., Rachmilevitch, S., Tiwari, B. S., Solomon, M., Levine, A. (2006). An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology*, 96(3), 299–307.
- Grzebelus, E., Szklarczyk, M., Greń, J., Śniegowska, K., Jopek, M., Kacińska, I., Mrozek, K. (2012). Phytosulfokine stimulates cell divisions in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mesophyll protoplast cultures. *Plant Growth Regulation*, 67, 93–100.
- Gualberti, G., Papi, M., Bellucci, L., Ricci, I., Bouchez, D., Camilleri, C., ... Vittorioso, P. (2002). Mutations in the Dof zinc finger genes *DAG2* and *DAG1* influence with opposite effects the germination of Arabidopsis seeds. *The Plant Cell*, 14(6), 1253–1263.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J. K., Jacobsen, J. V. (1995). Gibberellin regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI α amylase gene promoter. *The Plant Cell*, 7(11), 1879–1891.
- Guo, D., Liang, J., Li, L. (2009). Abscisic acid (ABA) inhibition of lateral root formation involves endogenous ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L.. *Plant Growth Regulation*, 58, 173–179.
- Guo, X. & Stotz, H. U. (2010). ABA signaling inhibits oxalate-induced production of reactive oxygen species and protects against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 7–19.
- Guo, Y., Cai, S., Gan, S. (2004). Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant, Cell and Environment*, 27, 521–549.
- Hager, A., Menzel, H., Krauss, A. (1971). Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta*, 100, 47–75.

- Halliday, K. J., Hudson, M., Ni, M., Qin, M., Quail, P. H. (1999). *poc1*: an Arabidopsis mutant perturbed in phytochrome signaling because of a T-DNA insertion in the promoter of *PIF3*, a gene encoding a phytochrome-interacting bHLH protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*, 5832–5837.
- Hammonds, A. S., Bristow, C. A., Fisher, W. W., Weizmann, R., Wu, S., Hartenstein, V., ... Celniker, S. E. (2013). Spatial expression of transcription factors in *Drosophila* embryonic organ development. *Genome Biology*, *14*(12), R140.
- Han, J., Tan, J., Tu, L., Zhang, X. (2014). A peptide hormone gene, GhPSK promotes fibre elongation and contributes to longer and finer cotton fibre. *Plant Biotechnology Journal*, *12*, 861–871.
- Han, P., García-Ponce, B., Fonseca-Salazar, G., Alvarez-Buylla, E. R., Yu, H. (2008). *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a *FT*-independent photoperiod pathway. *The Plant Journal*, *55*(2), 253–265.
- Harris, J. M. (2015). Abscisic acid: hidden architect of root system structure. *Plants (Basel, Switzerland)*, *4*(3), 548–572.
- Hartmann, J., Fischer, C., Dietrich, P., Sauter, M. (2014). Kinase activity and calmodulin binding are essential for growth signaling by the phytosulfokine receptor PSKR1. *The Plant Journal*, *78*, 192–202.
- Hartmann, J., Linke, D., Bönniger, C., Tholey, A., Sauter, M. (2015). Conserved phosphorylation sites in the activation loop of the Arabidopsis phytosulfokine receptor PSKR1 differentially affect kinase and receptor activity. *Biochemical Journal*, *472*, 379–391.
- Hartmann, J., Stührwohldt, N., Dahlke, R. I., Sauter, M. (2013). Phytosulfokine control of growth occurs in the epidermis, is likely to be non-cell autonomous and is dependent on brassinosteroids. *The Plant Journal*, *73*, 579–590.
- Hartung, W., Sauter, A., Hose, E. (2002). Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany*, *53*(366), 27–32.
- Hasson, A., Plessis, A., Blein, T., Adroher, B., Grigg, S., Tsiantis, M., ... Laufs, P. (2011). Evolution and diverse roles of the *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes in Arabidopsis leaf development. *The Plant Cell*, *23*(1), 54–68.
- He, X. J., Mu, R. L., Cao, W. H., Zhang, Z. G., Zhang, J. S., Y., C. S. (2005). AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal*, *44*, 903–916.
- Hectors, K., Prinsen, E., De Coen, W., Jansen, M. A., Guisez, Y. (2007). *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytologist*, *175*(2), 255–270.
- Hedden, P. & Graebe, J. E. (1985). Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol in cell-free homogenates of *Cucurbita maxima* endosperm and *Malus pumila* embryos. *Journal of Plant Growth Regulation*, *4*, 111.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., Bailey, P. C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, *20*, 735–747.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., G., S., ... Benfey, P. N. (2000). The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell*, *101*, 555–567.

- 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. *Physiologia Plantarum*, 143(1), 41–49.
- Heyman, J., Cools, T., Vandenbussche, F., Heyndrickx, K. S., Van Leene, J., Vercauteren, I., ... De Veylder, L. (2013). ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science*, 342(6160), 860–863.
- Hibara, K.-I., Karim, M. R., Takada, S., Taoka, K.-I., Furutani, M., Aida, M., Tasaka, M. (2006). Arabidopsis *CUP-SHAPED COTYLEDON3* Regulates Postembryonic Shoot Meristem and Organ Boundary Formation. *The Plant Cell*, 18(11), 2946–2957.
- Hibara, K., Takada, S., Tasaka, M. (2003). *CUC1* gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *The Plant Journal*, 36(5), 687–696.
- Hinz, M., Wilson, I. W., Yang, J., Buerstenbinder, K., Llewellyn, D., E.S., D., ... Dolferus, R. (2010). Arabidopsis *RAP2.2*: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiology*, 153(2), 757–772.
- Hirai, N., Yoshida, R., Todoroki, Y., Ohigashi, H. (2000). Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(7), 1448–1458.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., ... Fukuda, H. (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15208–15213.
- Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T., Ohme-Takagi, M. (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 34(5), 733–739.
- Hiratsua, K., Mitsuda, N., Matsui, K., Ohme-Takagi, M. (2004). Identification of the minimal repression domain of SUPERMAN shows that the DLELRL hexapeptide is both necessary and sufficient for repression of transcription in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(1), 172–178.
- Holzwardt, E., Huerta, A. I., Glöckner, N., Garnelo Gómez, B., Wanke, F., Augustin, S., ... Wolf, S. (2018a). BRI1 controls vascular cell fate in the Arabidopsis root through RLP44 and phytosulfokine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(46), 11838–11843.
- Holzwardt, E., Huerta, A. I., Gloeckner, N., Gomez, B. G., Ladwig, F., Augustin, S., ... Wolf, S. (2018b). Integration of brassinosteroid and phytosulfokine signalling controls vascular cell fate in the Arabidopsis root. *bioRxiv*, 244749.
- Hong, S.-Y., Kim, O.-K., Kim, S.-G., Yang, M.-S., Park, C.-M. (2011). Nuclear import and DNA binding of the ZHD5 transcription factor is modulated by a competitive peptide inhibitor in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(2), 1659–1668.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D. P. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*, 122(4), 1129–1136.
- Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., Hwang, S.-R. (2008). Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 393–423.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., ... Zimmermann, P. (2008). Genevestigator v3: A reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 2008, 420747.

- Hsiao, T. C. (1973). Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, *24*, 519–570.
- Hsiao, T. C., Acevedo, E., Fereres, E., Henderson, D. W. (1976). Stress metabolism - Water stress, growth, and osmotic adjustment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences*, *273*(927), 479–500.
- Hsiao, T. C. & Xu, L. K. (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany*, *51*(350), 1595–1616.
- Hu, W., Feng, B., Ma, H. (2011). Ectopic expression of the Arabidopsis *MINI ZINC FINGER1* and *MIF3* genes induces shoot meristems on leaf margins. *Plant Molecular Biology*, *76*(1-2), 57–68.
- Hu, W. & Ma, H. (2006). Characterization of a novel putative zinc finger gene MIF1: Involvement in multiple hormonal regulation of Arabidopsis development. *The Plant Journal*, *45*(3), 399–422.
- Hu, Y., Poh, H. M., Chua, N.-H. (2006). The Arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth. *The Plant Journal*, *47*, 1–9.
- Hu, Y., Xie, Q., Chua, N. H. (2003). The Arabidopsis auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size. *The Plant Cell*, *15*(9), 1951–1961.
- Huang, D., Wu, W., Abrams, S. R., Cutler, A. J. (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany*, *59*(11), 2991–3007.
- Huang, G.-T., Ma, S.-L., Bai, L.-P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., ... Guo, Z.-F. (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*, *39*(2), 969–987.
- Huang, K., Peng, L., Liu, Y., Yao, R., Liu, Z., Li, X., ... Wang, J. (2018). Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK1 plays a positive role in salt/drought-stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *498*(1), 92–98.
- Hummel, I., Pantin, F., Sulpice, R., Piques, M., Rolland, G., Dauzat, M., ... Muller, B. (2010). Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology*, *154*, 357–372.
- Huq, E. & Quail, P. H. (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, *21*, 2441–2450.
- Hussain, A., Black, C. R., Taylor, I. B., Roberts, J. A. (2000). Does an antagonistic relationship between ABA and ethylene mediate shoot growth when tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants encounter compacted soil? *Plant, Cell and Environment*, *23*, 1217–1226.
- Hyun, Y. & Lee, I. (2006). *KIDARI*, encoding a non-DNA binding bHLH protein, represses light signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, *61*(1-2), 283–296.
- Igarashi, D., Tsuda, K., Katagiri, F. (2012). The peptide growth factor, phyto-sulfokine, attenuates pattern-triggered immunity. *The Plant Journal*, *17*(2).
- Iida, A., Kazuoka, T., Torikai, S., Kikuchi, H., Oeda, K. (2000). A zinc finger protein RHL41 mediates the light acclimatization response in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *24*(2), 191–203.

- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., ... Watanabe, A. (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *The Plant Cell*, *13*, 1891–1906.
- Ito, S., Song, Y. H., Josephson-Day, A. R., Miller, R. J., Breton, G., Olmstead, R. G., Imaizumi, T. (2012). FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator *CONSTANS* in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(9), 3582–3587.
- Iturriaga, G., Leyns, L., Villeges, A., Gharaibeh, R., Salamini, F., Bartels, D. (1996). A family of novel myb-related genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* are specifically expressed in callus and roots in response to ABA or desiccation. *Plant Molecular Biology*, *32*, 707–716.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., ... Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *27*(4), 325–333.
- Jack, T., Brockman, L. L., Meyerowitz, E. M. (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, *68*, 683–697.
- Jensen, M. K., Hagedorn, P. H., de Torres-Zabala, M., Grant, M. R., Rung, J. H., Collinge, D. B., Lyngkjaer, M. F. (2008). Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *56*(6), 867–880.
- Jensen, M. K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M. M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C., Skriver, K. (2010). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: Structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal*, *426*(2), 183–196.
- Jeschke, W. D., Peuke, A. D., Pate, J. S., Hartung, W. (1997). Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *Journal of Experimental Botany*, *48*(314), 1737–1747.
- Jiang, C., Gu, J., Chopra, S., Gu, X., Peterson, T. (2004). Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. *Gene*, *326*, 13–22.
- Jiang, F. & Hartung, W. (2008). Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany*, *59*(1), 37–43.
- Jiang, Y. & Deyholos, M. K. (2009). Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible *WRKY25* and *WRKY33* transcription factors in abiotic stresses. *Plant Molecular Biology*, *69*(1-2), 91–105.
- Jiang, Y., Joyce, D. C., Macnish, A. J. (2000). Effect of abscisic acid on banana fruit ripening in relation to the role of ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, *19*, 106–111.
- Jofuku, K. D., den Boer, B. G., Van Montagu, M., Okamoto, J. K. (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell*, *6*, 1211–1225.
- Johnson, C. S., Kolevski, B., Smyth, D. R. (2002). *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor. *The Plant Cell*, *14*, 1359–1375.

- Journot-Catalino, N., Somssich, I. E., Roby, D., Kroj, T. (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 18(11), 3289–3302.
- Ju, C. & Chang, C. (2012). Advances in ethylene signalling: protein complexes at the endoplasmic reticulum membrane. *AoB Plants*, 2012, pls031.
- Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J., Bailey-Serres, J. (2014). Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, E203–E212.
- Kamata, N., Sugihara, A., Komeda, Y., Takahashi, T. (2013). Allele-specific effects of *PDF2* on floral morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(12), e27417.
- Kamiya, M., Higashio, S. Y., Isomoto, A., Kim, J. M., Seki, M., Miyashima, S., Nakajima, K. (2016). Control of root cap maturation and cell detachment by BEARSKIN transcription factors in Arabidopsis. *Development*, 143(21), 4063–4072.
- Kang, H. G., Foley, R. C., Oñate-Sánchez, L., Lin, C., Singh, K. B. (2003). Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *The Plant Journal*, 35(3), 362–372.
- Kang, J., Yu, H., Tian, C., Zhou, W., Li, C., Jiao, Y., Liu, D. (2014). Suppression of photosynthetic gene expression in roots is required for sustained root growth under phosphate deficiency. *Plant Physiology*, 165(3), 1156–1170.
- Kang, Y. H., Kirik, V., Hulskamp, M., Nam, K. H., Hagely, K., Lee, M. M., Schiefelbein, J. (2009). The *MYB23* gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the Arabidopsis root epidermis. *The Plant Cell*, 21, 1080–1094.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195.
- Karssen, C., Brinkhorst-van der Swan, D., Breekland, A., Koornneef, M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies of abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 157, 158–165.
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., ... Sakakibara, H. (2004). Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 14049–14054.
- Kazan, K. & Manners, J. M. (2013). MYC2: the master in action. *Molecular Plant*, 6, 686–703.
- Kiełkowska, A. & Adamus, A. (2018). Peptide growth factor phytosulfokine- α stimulates cell divisions and enhances regeneration from *B. oleracea* var. *capitata* L. protoplast culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1–14. doi: <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9903-y>
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., ... Harter, K. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal*, 50(2), 347–363.
- Kim, J.-S., Mizoi, J., Yoshida, T., Fujita, Y., Nakajima, J., Ohori, T., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* Gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), 2136–2146.
- Kim, J. & Kim, H. Y. (2006). Molecular characterization of a bHLH transcription factor involved in Arabidopsis abscisic acid-mediated response. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1759, 191–194

- Kim, K. C., Lai, Z., Fan, B., Chen, Z. (2008). Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *The Plant Cell*, *20*, 2357–2371.
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., Schroeder, J. I. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 561–591.
- Kim, Y. S., Kim, S. G., Park, J. E., Park, H. Y., Lim, M. H., Chua, N. H., Park, C. M. (2006). A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *18*(11), 3132–3144.
- Kim, Y. S. & Park, C. M. (2007). Membrane regulation of cytokinin-mediated cell division in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, *2*(1), 15–16.
- Kleine, T., Kindgren, P., Benedict, C., Hendrickson, L., Strand, A. (2007). Genome-wide gene expression analysis reveals a critical role for CRYPTOCHROME1 in the response of Arabidopsis to high irradiance. *Plant Physiology*, *144*(3), 1391–1406.
- Klempnauer, K. H., Gonda, T. J., Bishop, J. M. (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene. *Cell*, *31*(2), 453–463.
- Kline, K. G., Sussman, M. R., Jones, A. M. (2010). Abscisic Acid Receptors. *Plant Physiology*, *154*, 479–482.
- Ko, J. H., Han, K. H., Park, S., Yang, J. (2004). Plant body weight-induced secondary growth in Arabidopsis and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiology*, *135*(2), 1069–1083.
- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., ... Hattori, T. (2005). Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *The Plant Journal*, *44*(6), 939–949.
- Koizumi, K., Wu, S., MacRae-Crerar, A., Gallagher, K. L. (2011). An essential protein that interacts with endosomes and promotes movement of the SHORT-ROOT transcription factor. *Current Biology*, *21*(18), 1559–1564.
- Komori, R., Amano, Y., Ogawa-Ohnishi, M., Matsubayashi, Y. (2009). Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(35), 15067–15072.
- Koncz, C. & Schell, J. (1986). The promoter of T₁-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular & General Genetics*, *204*, 383–396.
- Kong, X., Tian, H., Yu, Q., Zhang, F., Wang, R., Gao, S., ... Ding, Z. (2018). PHB3 maintains root stem cell niche identity through ROS-responsive AP2/ERF transcription factors in Arabidopsis. *Cell Reports*, *22*, 1350–1363.
- Konishi, M., Donner, T., Scarpella, E., Yanagisawa, S. (2015). MONOPTEROS directly activates the auxin-inducible promoter of *DOF5.8* transcription factor gene in *Arabidopsis thaliana* leaf provascular cells. *Journal of Experimental Botany*, *66*, 283–291.
- Koshimizu, K., Fukui, H., Mitsui, T., Ogawa, Y. (1966). Identity of lupin inhibitor with abscisic acid and its biological activity on growth of rice seedlings. *Agricultural and Biological Chemistry*, *30*(9), 941–943.
- Kotak, S., Vierling, E., Bäumllein, H., von Koskull-Döring, P. (2001). A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. *The Plant Cell*, *19*(1), 182–195.

- Koyama, T., Sato, F., Ohme-Takagi, M. (2017). Roles of miR319 and TCP transcription factors in leaf development. *Plant Physiology*, 175, 874–885.
- Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., ... Weisshaar, B. (2001). Towards functional characterisation of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(2), 263–276.
- Krasensky, J. & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593–1608.
- Kravtsov, A., Zubo, Y., Yamburenko, M., Kulaeva, O., Kusnetsov, V. (2011). Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling de-etiolation. *Plant Growth Regulation*, 64, 173–183.
- Krizek, B. A. (1999). Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs. *Developmental Genetics*, 25, 224–236.
- Krizek, B. A. & Meyerowitz, E. M. (1996). The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development*, 122(1), 11–22.
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 protein kinases - key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS*, 15(12), 859–872.
- Kurbidaeva, A., Ezhova, T., Novokreshchenova, M. (2014). *Arabidopsis thaliana* *ICE2* gene: phylogeny, structural evolution and functional diversification from *ICE1*. *Plant Science*, 229, 10–22.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., ... Nambara, E. (2004). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: Key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO Journal*, 23(7), 1647–1656.
- Kusnetsov, V. V., Herrmann, R. G., Kulaeva, O. N., Oelmüller, R. (1998). Cytokinin stimulates and abscisic acid inhibits greening of etiolated *Lupinus luteus* cotyledons by affecting the expression of the light-sensitive protochlorophyllide oxidoreductase. *Molecular & General Genetics*, 259, 21–28.
- Kutschmar, A., Rzewuski, G., Stührwohldt, N., Beemster, G. T. S., Inzé, D., Sauter, M. (2009). PSK- α promotes root growth in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 181, 820–831.
- Kwezi, L., Ruzvidzo, O., Wheeler, J. I., Govender, K., Iacuone, S., Thompson, P. E., ... Irving, H. R. (2011). The phytosulfokine (PSK) receptor is capable of guanylate cyclase activity and enabling cyclic GMP-dependent signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22580–22588.
- Kwon, C. S., Hibara, K., Pfluger, J., Bezhani, S., Metha, H., Aida, M., ... Wagner, D. (2006). A role for chromatin remodeling in regulation of *CUC* gene expression in the *Arabidopsis* cotyledon boundary. *Development*, 133(16), 3223–3230.
- Lacek, J., Retzer, K., Luschnig, C., Zažímalová, E. (2017). Polar auxin transport. *eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester*. doi: 10.1002/9780470015902.a0020116.pub2
- Ladwig, F., Dahlke, R. I., Stührwohldt, N., Hartmann, J., Harter, K., Sauter, M. (2015). Phytosulfokine regulates growth in *Arabidopsis* through a response module at the plasma membrane that includes CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL17, H⁺-ATPase, and BAK1. *The Plant Cell*, 27(6), 1718–1729.
- Lai, L. B., Nadeau, J. A., Lucas, J., Lee, E.-K., Nakagawa, T., Zhao, L., ... Sack, F. D. (2005). The *Arabidopsis* R2R3 MYB proteins FOUR LIPS and MYB88 restrict divisions late in the stomatal cell lineage. *The Plant Cell*, 17(10), 2754–2767.

- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.
- Latchmann, D. S. (1997). Transcription factors: an overview. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29(12), 1305–1312.
- Laughon, A. (1991). DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry*, 30(48), 11357–11367.
- Le Hir, R. & Bellini, C. (2013). The plant-specific Dof transcription factors family: new players involved in vascular system development and functioning in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 4, 164.
- Lee, B. H., Henderson, D. A., Zhu, J. K. (2005). The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell*, 17(11), 3155–3175.
- Lee, D. J., Park, J. Y., Ku, S. J., Ha, Y. M., Kim, S., Kim, M. D., ... Kim, J. (2007a). Genome-wide expression profiling of *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7)* overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(2), 115–137.
- Lee, D. K., Geisler, M., Springer, P. S. (2009a). *LATERAL ORGAN FUSION1* and *LATERAL ORGAN FUSION2* function in lateral organ separation and axillary meristem formation in Arabidopsis. *Development*, 136, 2423–2432.
- Lee, E., Liu, X., Eglit, Y., Sack, F. D. (2013). FOUR LIPS and MYB88 conditionally restrict the G1/S transition during stomatal formation. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), 5207–5219.
- Lee, H., Guo, Y., Ohta, M., Xiong, L., Stevenson, B., Zhu, J.-K. (2002). *LOS2*, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *The EMBO Journal*, 21(11), 2692–2702.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., ... Deng, X. W. (2007b). Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *The Plant Cell*, 19(3), 731–749.
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H. Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., ... Hwang, I. (2006a). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, 126, 1109–1120.
- Lee, S.-J., Kang, J.-Y., Park, H.-J., Kim, M. D., Bae, M. S., Choi, H.-I., Kim, S. Y. (2010). DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. *Plant Physiology*, 2010(153), 716–727.
- Lee, S., Lee, S., Yang, K. Y., Kim, Y. M., Park, S. Y., Kim, S. Y., Soh, M. S. (2006b). Overexpression of *PRE1* and its homologous genes activates Gibberellin-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 47(5), 591–600.
- Lee, S. A., Jang, S., Yoon, E. K., Heo, J.-O., Chang, K. S., Choi, J., W., ... Lim, J. (2016). Interplay between ABA and GA modulates the timing of asymmetric cell divisions in the Arabidopsis root ground tissue. *Molecular Plant*, 9(6), 870–884.
- Lee, S. C., Lan, W., Buchanan, B. B., Luan, S. (2009b). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21419–21424.
- Lei, Q., Lee, E., Keerthisinghe, S., Lai, L., Li, M., Lucas, J. R., ... Sack, F. D. (2015). The *FOUR LIPS* and *MYB88* transcription factor genes are widely expressed in *Arabidopsis thaliana* during development. *American Journal of Botany*, 102(9), 1521–1528.
- Leivar, P., Tepperman, J. M., Cohn, M. M., Monte, E., Al-Sady, B., Erickson, E., Quail, P. H. (2012). Dynamic antagonism between phytochromes and PIF family basic helix-loop-

- helix factors induces selective reciprocal responses to light and shade in a rapidly responsive transcriptional network in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(4), 1398–1419.
- LeNoble, M. E., Spollen, W. G., Sharp, R. E. (2004). Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 237–245.
- Leung, J. & Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 199–222.
- Lewis, D. R., Negi, S., Sukumar, P., Muday, G. K. (2011). Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development*, 138, 3485–3495.
- Li, C., Chang, P.-P., Ghebremariam, K. M., Qin, L., Liang, Y. (2014). Overexpression of tomato *SpMPK3* gene in Arabidopsis enhances the osmotic tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 357–362.
- Li, H.-H., Hao, R.-L., Wu, S.-S., Guo, P.-C., Chen, C.-J., Pan, L.-P., Ni, H. (2011). Occurrence, function and potential medicinal applications of the phytohormone abscisic acid in animals and humans. *Biochemical Pharmacology*, 82(7), 701–712.
- Li, H., Sun, J., Xu, Y., Jiang, H., Wu, X., Li, C. (2007). The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 65(5), 655–665.
- Li, H. Y., Xiao, S., Chye, M. L. (2008). Ethylene- and pathogen-inducible Arabidopsis acyl-CoA-binding protein 4 interacts with an ethylene-responsive element binding protein. *Journal of Experimental Botany*, 59, 3997–4006.
- Li, J. & Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 90(5), 929–938.
- Li, S. J., Zhou, X., Chen, L. G., Huang, W. D., Yu, D. Q. (2010a). Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress. *Molecules and Cells*, 29(5), 475–483.
- Li, X., Duan, X., Jiang, H., Sun, Y., Tang, Y., Yuan, Z., ... Zhang, D. (2006). Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis. *Plant Physiology*, 141(4), 1167–1184.
- Li, X. G., Su, Y. H., Zhao, X. Y., Li, W., Gao, X. Q., Zhang, X. S. (2010b). Cytokinin overproduction-caused alteration of flower development is partially mediated by *CUC2* and *CUC3* in Arabidopsis. *Gene*, 450(1–2), 109–120.
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E.-K., Bowles, D. J. (2001). Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4338–4343.
- Li, Y. & Walton, D. C. (1990). Violaxanthin is an abscisic acid precursor in water-stressed dark-grown bean leaves. *Plant Physiology*, 92, 551–559.
- Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Udvardi, M., Stacey, G. (2007). Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(8), 900–911.
- Licausi, F., van Dongen, J. T., Giuntoli, B., Novi, G., Santaniello, A., Geigenberger, P., Perata, P. (2010). HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 63, 302–315.
- Lie, C., Kelsom, C., Wu, X. (2012). *WOX2* and *STIMPY-LIKE/WOX8* promote cotyledon boundary formation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 72(4), 674–682.
- Lim, C. W., Baek, W., Jung, J., Kim, J.-H., Lee, S. C. (2015). Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15251–15270.

- Lim, E.-K., Doucet, C. J., Hou, B., Jackson, R. G., Abrams, S. R., Bowles, D. J. (2005). Resolution of (+)-abscisic acid using an Arabidopsis glycosyltransferase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(1), 143–147.
- Lim, P. O., Kim, H. J., Gil Nam, H. (2007). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 115–136.
- Lin, Q. & Aoyama, T. (2012). Pathways for epidermal cell differentiation via the homeobox gene *GLABRA2*: update on the roles of the classic regulator. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(10), 729–737.
- Lindsey, K., Casson, S., Chilley, P. (2002). Peptides: new signalling molecules in plants. *Trends in Plant Science*, 7, 78–83.
- Lippold, F., Sanchez, D. H., Musialak, M., Schlereth, A., Scheible, W. R., Hinch, D. K., Udvardi, M. K. (2009). AtMyb41 regulates transcriptional and metabolic responses to osmotic stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 149, 1761–1772.
- Lippuner, V., Cyert, M. S., Gasser, C. S. (1996). Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 12859–12866.
- Liu, L., White, M. J., MacRae, T. H. (1999). Transcription factors and their genes in higher plants - Functional domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry*, 262, 247–257.
- Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J.-P., Bouzayen, M. (2015a). Ethylene control of fruit ripening: Revisiting the complex network of transcriptional regulation. *Plant Physiology*, 169(4), 2380–2390.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10, 1391–1406.
- Liu, W., Li, Q., Wang, Y., Wu, T., Yang, Y., Zhang, X., ... Xu, X. (2017). Ethylene response factor AtERF72 negatively regulates *Arabidopsis thaliana* response to iron deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(3), 862–868.
- Liu, W., Tai, H., Li, S., Gao, W., Zhao, M., Xie, C., Li, W. X. (2014). bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in Arabidopsis and in the repression of ABA catabolism. *New Phytologist*, 201(4), 1192–1204.
- Liu, Y., Ji, X., Nie, X., Qu, M., Zheng, L., Tan, Z., ... Wang, Y. (2015b). Arabidopsis AtbHLH112 regulates the expression of genes involved in abiotic stress tolerance by binding to their E-box and GCG-box motifs. *New Phytologist*, 207(3), 692–709.
- Liu, Z., Yan, J.-P., Li, D.-K., Luo, Q., Yan, Q., Liu, Z.-B., ... Yang, Y. (2015c). UDP-Glucosyltransferase71C5, a major glucosyltransferase, mediates abscisic acid homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 167(4), 1659–1670.
- Loivamäki, M., Stührwohldt, N., Deeken, R., Steffens, B., Roitsch, T., Hedrich, R., Sauter, M. (2010). A role for PSK signaling in wounding and microbial interactions in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum*, 139(4), 348–357.
- Long, Y., Scheres, B., Blilou, I. (2015). The logic of communication: roles for mobile transcription factors in plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(4), 1133–1144.
- Lorbiecke, R. & Sauter, M. (2002). Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. *Plant Science*, 163, 321–332.
- Lu, P. L., Chen, N. Z., An, R., Su, Z., Qi, B. S., Ren, F., ... Wang, X. C. (2007). A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a NAC family protein that negatively regulates the

- expression of stress-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 63(2), 289–305.
- Ma, P. C. M., Rouls, M. A., Weintraub, H., Pabo, C. O. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*, 77, 451–459.
- Ma, S., Gong, Q., Bohnert, H. J. (2006). Dissecting salt stress pathways. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1097–1107.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930), 1064–1068.
- MacRobbie, E. A. C. (1995). ABA-induced ion efflux in stomatal guard cells: multiple actions of ABA inside and outside the cell. *The Plant Journal*, 7(4), 565–576.
- Maggio, A., Zhu, J. K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (2006). Osmogenetics: Aristotle to Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18, 1542–1557.
- Makkena, S., Lee, E., Sack, F. D., Lamb, R. S. (2012). The R2R3 MYB transcription factors FOUR LIPS and MYB88 regulate female reproductive development. *Journal of Experimental Botany*, 63(15), 5545–5558.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B. M., Choi, G., Koo, Y. J., ... Browse, J. (2006). Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. *The Plant Journal*, 46(6), 984–1008.
- Manners, J. M., Penninckx, I. A. M. A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R. L., Morgan, A., ... Broekaert, W. F. (1998). The promoter of the plant defensin gene *PDF1.2* from Arabidopsis is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Molecular Biology*, 38(6), 1071–1080.
- Mara, C. D., Huang, T., Irish, V. F. (2010). The Arabidopsis floral homeotic proteins APETALA3 and PISTILLATA negatively regulate the *BANQUO* genes implicated in light signaling. *The Plant Cell*, 22(3), 690–702.
- Marín-de la Rosa, N., Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D. J., Vicente, J., Carbonero, P., ... Blázquez, M. A. (2014). Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. *Plant Physiology*, 166(2), 1022–1032.
- Markakis, M. N., De Cnodder, T., Lewandowski, M., Simon, D., Boron, A., Balcerowicz, D., ... Vissenberg, K. (2012). Identification of genes involved in the ACC-mediated control of root cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 12, 208.
- Martin, C. & Paz-Ares, J. (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics*, 13(2), 67–73.
- Matsubayashi, Y. (2011a). Post-translational modifications in secreted peptide hormones in plants. *Plant Cell Physiology*, 52(1), 5–13.
- Matsubayashi, Y. (2011b). Small post-translationally modified peptide signals in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, 9, e0150.
- Matsubayashi, Y., Hanai, H., Hara, O., Sakagami, Y. (1996). Active fragments and analogs of the plant growth factor, phytosulfokine: structure–activity relationships. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225(1), 209–214.
- Matsubayashi, Y., Morita, A., Matsunaga, S., Furuya, A., hanai, N., Sakagami, Y. (1999a). Physiological relationships between auxin, cytokinin, and a peptide growth factor, phytosulfokine- α , in stimulation of asparagus cell proliferation. *Planta*, 207(4), 559–565.

- Matsubayashi, Y., Ogawa, M., Kihara, H., Niwa, M., Sakagami, Y. (2006). Disruption and overexpression of Arabidopsis phyto-sulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiology*, 142, 44–53.
- Matsubayashi, Y., Ogawa, M., Morita, A., Sakagami, Y. (2002). An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phyto-sulfokine. *Science*, 296, 1470–1472.
- Matsubayashi, Y. & Sakagami, Y. (1996). Phyto-sulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 7623–7627.
- Matsubayashi, Y., Takagi, L., Omura, N., Morita, A., Sakagami, Y. (1999b). The endogenous sulfated pentapeptide phyto-sulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of *Zinnia*. *Plant Physiology*, 120, 1043–1048.
- Matsuzaki, Y., Ogawa-Ohnishi, M., Mori, A., Matsubayashi, Y. (2010). Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in Arabidopsis. *Science*, 329, 1065–1067.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*, 95(6), 805–815.
- Mazumder, M., Das, S., Saha, U., Chatterjee, M., Bannerjee, K., Basu, D. (2013). Salicylic acid-mediated establishment of the compatibility between *Alternaria brassicicola* and *Brassica juncea* is mitigated by abscisic acid in *Sinapis alba*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 43–51.
- McAdam, S. A. M., Manzi, M., Ross, J. J., Brodribb, T. J., Gómez-Cadenas, A. (2016). Uprooting an abscisic acid paradigm: shoots are the primary source. *Plant Signaling & Behavior*, 11(6), e1169359.
- McGinnis, W., Levine, M. S., Hafén, E., Kuroiwa, A., Gehring, W. J. (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*, 308, 428–433.
- Meissner, R. C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., ... Bevan, M. A. (1999). Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *The Plant Cell*, 11, 1827–1840.
- Melo, N. K. G., Bianchetti, R. E., Lira, B. S., Oliveira, P. M. R., Zuccarelli, R., Dias, D. L. O., ... Freschi, L. (2016). Nitric oxide, ethylene, and auxin cross talk mediates greening and plastid development in deetioliating tomato seedlings. *Plant Physiology*, 170(4), 2278–2294.
- Meur, G., Shukla, P., Dutta-Gupta, A., Kirti, P. B. (2015). Characterization of *Brassica juncea*–*Alternaria brassicicola* interaction and jasmonic acid carboxyl methyl transferase expression. *Plant Gene*, 3, 1–10.
- Meyer, R. F. & Boyer, J. S. (1972). Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. *Planta*, 108(1), 77–87.
- Milborrow, B. V. & Lee, H. S. (1998). Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI. Carotenoids and ABA are formed by the ‘non-mevalonate’ triose-pyruvate pathway in chloroplasts. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25(5), 507–512.
- Mittler, R., Kim, Y., Song, L., Coutu, J., Coutu, A., Ciftci-Yilmaz, S., ... Zhu, J.-K. (2006). Gain- and loss-of-function mutations in ZAT10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Letters*, 580(28-29), 6537–6542.

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498.
- Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2), 86–96.
- Mizukami, Y. & Fischer, R. L. (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 942–947.
- Mohr, P. G. & Cahill, D. M. (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Functional & Integrative Genomics*, 7, 181–191.
- Moore, K. L. (2003). The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 24243–24246.
- Moore, M., Vogel, M. O., Dietz, K.-J. (2014). The acclimation response to high light is initiated within seconds as indicated by upregulation of AP2/ERF transcription factor network in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 9(10), 976479.
- Mosher, S. & Kemmerling, B. (2013). PSKR1 and PSY1R-mediated regulation of plant defense responses. *Plant Signaling & Behavior*, 8(5), e24119.
- Mosher, S., Seybold, H., Rodriguez, P., Stahl, M., Davies, K. A., Dayaratne, S., ... Kemmerling, B. (2013). The tyrosine-sulfated peptide receptors PSKR1 and PSY1R modify the immunity of *Arabidopsis* to biotrophic and necrotrophic pathogens in an antagonistic manner. *The Plant Journal*, 73(3), 469–482.
- Muller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M., Gibon, Y. (2011). Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1715–1729.
- Munekage, Y. N., Inoue, S., Yoneda, Y., Yokota, A. (2015). Distinct palisade tissue development processes promoted by leaf autonomous signalling and long-distance signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 38, 1116–1126.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 239–250.
- Munns, R. & Termaat, A. (1986). Whole plant response to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, 143–160.
- Munns, R. & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681.
- Munns, R., Tonnet, M. L., Shennan, C., Gardner, P. A. (1988). Effect of high external NaCl concentrations on ion transport within the shoot of *Lupinus albus*. II. Ions in phloem sap. *Plant, Cell and Environment*, 11, 291–300.
- Murphy, E., Smith, S., De Smet, I. (2012). Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: How cells communicate over a short distance. *The Plant Cell*, 24, 3198–3217.
- Murre, C., McCaw, P. S., Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD and myc proteins. *Cell*, 56, 777–783.
- Mustroph, A., Zanetti, M. E., Jang, C. J. H., Holtan, H. E., Repetti, P. P., W., G. D., ... Bailey-Serres, J. (2009). Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 18843–18848.
- Nair, S. K. & Burley, S. K. (2000). Recognizing DNA in the library. *Nature*, 404, 715–717.

- Nakamura, M., Katsumata, H., Abe, M., Yabe, N., Komeda, Y., Yamamoto, K. T., Takahashi, T. (2006). Characterization of the class IV homeodomain-leucine zipper gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *141*, 1363–1375.
- Nakano, T. & Ito, Y. (2013). Molecular mechanisms controlling plant organ abscission. *Plant Biotechnology*, *30*, 209–216.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., Shinshi, H. (2006a). Genome-wide Analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, *140*, 411–432.
- Nakano, T., Suzuki, K., Ohtsuki, N., Tsujimoto, Y., Fujimura, T., Shinshi, H. (2006b). Identification of genes of the plant-specific transcription-factor families cooperatively regulated by ethylene and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, *119*(4), 407–413.
- Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology*, *42*(4), 657–665.
- Nakata, M., Mitsuda, N., Herde, M., Koo, A. J., Moreno, J. E., Suzuki, K., ... Ohme-Takagi, M. (2013). A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *25*, 1641–1656.
- Nakata, M. & Ohme-Takagi, M. (2013). Two bHLH-type transcription factors, JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE2 and JAM3, are transcriptional repressors and affect male fertility. *Plant Signaling & Behavior*, *8*, e26473.
- Nakayama, T., Shinohara, H., Tanaka, M., Baba, K., Ogawa-Ohnishi, M., Matsubayashi, Y. (2017). A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in *Arabidopsis* roots. *Science*, *355*(6322), 284–286.
- Nambara, E. & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, *56*, 165–185.
- Narasimhan, K., Lambert, S. A., Yang, A. W., Riddell, J., Mnaimneh, S., Zheng, H., ... Hughes, T. R. (2015). Mapping and analysis of *Caenorhabditis elegans* transcription factor sequence specificities. *eLife*, *4*, e06967.
- Nardmann, J., Reisewitz, P., Werr, W. (2009). Discrete shoot and root stem cell-promoting WUS/WOX5 functions are an evolutionary innovation of angiosperms. *Molecular Biology and Evolution*, *26*(8), 1745–1755.
- Negi, J., Moriwaki, K., Konishi, M., Yokoyama, R., Nakano, T., Kusumi, K., ... Iba, K. (2013). A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in *Arabidopsis*. *Current Biology*, *23*(6), 479–484.
- Negi, S., Ivanchenko, M. G., Muday, G. K. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *55*(2), 175–187.
- Nguyen, H. T., Babu, R. C., Blum, A. (1997). Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. *Crop Science*, *37*(5), 1426–1434.
- Nguyen, X. C., Kim, S. H., Lee, K., Kim, K. E., Liu, X.-M., Han, H. J., ... Chung, W. S. (2012). Identification of a C₂H₂-type zinc finger transcription factor (ZAT10) from *Arabidopsis* as a substrate of MAP kinase. *Plant Cell Reports*, *31*(4), 737–745.
- Ni, J., Guo, Y., Jin, H., Hartsell, J., Clark, S. E. (2011). Characterization of a CLE processing activity. *Plant Molecular Biology*, *75*, 67–75.
- Nibau, C., Gibbs, D. J., Coates, J. C. (2008). Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist*, *179*, 595–614.

- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S. Y., Wang, A., Carvalho, P. C., ... Schroeder, J. I. (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *61*(2), 290–299.
- Noda, K. I., Glover, B. J., Linstead, P., Martin, C. (1994). Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature*, *369*, 661–664.
- North, H., De Almeida, A., Boutin, J.-P., Frey, A., To, A., Botran, L., ... Marion-Poll, A. (2007). The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal*, *50*(5), 810–824.
- Nuccio, M. L., Rhodes, D., McNeil, S. D., Hanson, A. D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, *2*, 128–134.
- Nuruzzaman, M., Shari, A. M., Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 248.
- Ogawa, E., Yamada, Y., Sezaki, N., Kosaka, S., Kondo, H., Kamata, N., ... Takahashi, T. (2015). *ATML1* and *PDF2* play a redundant and essential role in Arabidopsis embryo development. *Plant and Cell Physiology*, *56*(6), 1183–1192.
- Ogawa, M., Kay, P., Wilson, S., Swain, S. M. (2009). ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *21*, 216–233.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., Matsubayashi, Y. (2008). Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*, *319*(5861), 294.
- Ogawa, T., Pan, L., Kawai-Yamada, M., Yu, L. H., Yamamura, S., Koyama, T., ... Uchimiya, H. (2005). Functional analysis of Arabidopsis ethylene-responsive element binding protein conferring resistance to Bax and abiotic stress-induced plant cell death. *Plant Physiology*, *138*, 1436–1445.
- Ogawa, T., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2007). Mutual regulation of *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein and a plant floral homeotic gene, *APETALA2*. *Annals of Botany*, *99*(2), 239–244.
- Oh, E., Kim, J., Park, E., Kim, J. I., Kang, C., Choi, G. (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *16*(11), 3045–3058.
- Ohashi-Ito, K. & Bergmann, D. C. (2006). Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *The Plant Cell*, *18*, 2493–2505.
- Ohkuma, K., Lyon, J. L., Addicott, F. T., Smith, O. E. (1963). Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science*, *142*(3599), 1592–1593.
- Ohme-Takagi, M. & Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*, *7*, 173–182.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., ... Nambara, E. (2006). *CYP707A1* and *CYP707A2*, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *141*(1), 97–107.
- Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., Kawaguchi, M. (2013). Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nature Communications*, *4*, 2191.

- Olsen, A. N., Ernst, H. A., Leggio, L. L., Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*, 10(2), 79–87.
- Olsen, A. N., Ernst, H. A., Lo Leggio, L., Johansson, E., Larsen, S., Skriver, K. (2004). Preliminary crystallographic analysis of the NAC domain of ANAC, a member of the plant-specific NAC transcription factor family. *Acta Crystallographica, Section D, Biological Crystallography*, 60, 112–115.
- Oppenheimer, D. G., Hertman, P. L., Sivakumaran, S., Esch, J. (1991). A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Cell*, 67, 483–493.
- Osmolovskaya, N., Shumilina, J., Kim, A., Didio, A., Grishina, T., Bilova, T., ... Wessjohann, L. A. (2018). Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), E4089.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Bläsing, O. E., Höhne, M., ... Stitt, M. (2007). Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal*, 49(3), 463–491.
- Pandey, S., Nelson, D. C., Assmann, S. M. (2009). Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. *Cell*, 136(1), 136–148.
- Pandey, S. P. & Somssich, I. E. (2009). The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiology*, 150(4), 1648–1655.
- Papdi, C., Abrahám, E., Joseph, M. P., Popescu, C., Koncz, C., Szabados, L. (2008). Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiology*, 147, 528–542.
- Papdi, C., Pérez-Salamó, I., Joseph, M. P., Giuntoli, B., Bögre, L., Koncz, C., Szabados, L. (2015). The low oxygen, oxidative and osmotic stress responses synergistically act through the ethylene response factor VII genes *RAP2.12*, *RAP2.2* and *RAP2.3*. *The Plant Journal*, 82(5), 772–784.
- Papi, M., Sabatini, S., Bouchez, D., Camilleri, C., Costantino, P., Vittorioso, P. (2000). Identification and disruption of an Arabidopsis zinc finger gene controlling seed germination. *Genes & Development*, 14(1), 28–33.
- Pařenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., ... Colombo, L. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS World. *The Plant Cell*, 15(7), 1538–1551.
- Parent, B., Hachez, C., Redondo, E., Simonneau, T., Chaumont, F., Tardieu, F. (2009). Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant Physiology*, 149, 2000–2012.
- Park, C. Y., Lee, J. H., Yoo, J. H., Moon, B. C., Choi, M. S., Kang, Y. H., ... Cho, M. J. (2005). WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Letters*, 579(6), 1545–1550.
- Park, D. H., Lim, P. O., Kim, J. S., Cho, D. S., Hong, S. H., Nam, H. G. (2003). The Arabidopsis *COG1* gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *The Plant Journal*, 34(2), 161–171.
- Park, J., Lee, N., Kim, W., Lim, S., Choi, G. (2011). ABI3 and PIL5 collaboratively activate the expression of *SOMNUS* by directly binding to its promoter in imbibed Arabidopsis seeds. *The Plant Cell*, 23, 1404–1415.

- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., ... Cutler, S. R. (2010). Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. *Science*, 324(5930), 1068–1071.
- Parry, A. D., Babiano, M. J., Horgan, R. (1990). The role of *cis*-carotenoids in abscisic acid biosynthesis. *Planta*, 182, 118–128.
- Pauwels, L., Morreel, K., de Witte, E., Lammertyn, F., van Montagu, M., Boerjan, W., ... Goossens, A. (2008). Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(4), 1380–1385.
- Payne, C. T., Zhang, F., Lloayd, A. M. (2000). *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics*, 156(3), 1349–1362.
- Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J., Ryan, C. A. J. (2001). RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 12843–12847.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C. A. (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, 253(5022), 895–897.
- Perchepied, L., Balagué, C., Riou, C., Claudel-Renard, C., Rivière, N., Grezes-Besset, B., Roby, D. (2010). Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 846–860.
- Petrášek, J. & Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136, 2675–2688.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, e45.
- Pillitteri, L. J. & Torii, K. U. (2007). Breaking the silence: three bHLH proteins direct cell-fate decisions during stomatal development. *BioEssays*, 29(9), 861–870.
- Pinheiro, C. & Chaves, M. M. (2010). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 869–882.
- Planes, M. D., Niñoles, R., Rubio, L., Bissoli, G., Bueso, E., García-Sánchez, M. J., ... Serrano, R. (2014). A mechanism of growth inhibition by abscisic acid in germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* based on inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase and decreased cytosolic pH, K⁺, and anions. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 813–825.
- Pyott, D. E. & Molnar, A. (2015). Going mobile: Non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants. *Plant Biotechnology Journal*, 13(3), 306–318.
- Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L. S., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2008). Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *The Plant Cell*, 20(6), 1693–1707.
- Qin, F., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant Cell Physiology*, 52, 1569–1582.
- Qin, X. & Zeevaart, J. A. D. (1999). The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 15354–15361.

- Qin, Z., Zhang, X., Zhang, X., Feng, G., Hu, Y. (2014). The Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED 2 is involved in regulation of cell expansion during organ growth. *BMC Plant Biology*, 14, 349.
- Qu, L.-J. & Zhu, Y.-X. (2006). Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(5), 544–549.
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., K ufner, I., Engelhardt, S., Gust, A. A., ... N urnberger, T. (2006). Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. *Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins*, 18(12), 3721–3744.
- Raffaele, S., Rivas, S., Roby, D. (2006). An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 580, 3498–3504.
- Rai, M. I., Wang, X., Thibault, D. M., Kim, H. J., Bombyk, M. M., Binder, B. M., ... Schaller, G. E. (2015). The ARGOS gene family functions in a negative feedback loop to desensitize plants to ethylene. *BMC Plant Biology*, 15, 157.
- Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G., Somerville, S. (2005). Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology*, 138(2), 1027–1036.
- Ray, P. M., Green, P. B., Cleland, R. (1972). Role of turgor in plant cell growth. *Nature*, 239, 163–164.
- Rayle, D. L. (1973). Auxin-induced hydrogen-ion secretion in *Avena* coleoptiles and its implications. *Planta*, 114, 63–73.
- Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99, 1271–1274.
- Ren, T., Qu, F., Morris, T. J. (2000). HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *The Plant Cell*, 12(10), 1917–1926.
- Ren, X., Chen, Z., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, M., Liu, Q., ... Gong, Z. (2010). ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 63(3), 417–429.
- Resnick, J. S., Wen, C. K., Shockey, J. A., Chang, C. (2006). REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7917–7922.
- Reyes, J. L. & Chua, N.-H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, 49, 592–606.
- Reymond, M., Muller, B., Leonardi, A., Charcosset, A., Tardieu, F. (2003). Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiology*, 131, 664–675.
- Rhee, D. Y., Cho, D.-Y., Zhai, B., Slattery, M., Ma, L., Mintseris, J., ... Artavanis-Tsakonas, S. (2014). Transcription factor networks in *Drosophila melanogaster*. *Cell Reports*, 8(6), 2031–2043.
- Riechmann, J. L. (2002). Transcriptional regulation: a genomic overview. *The Arabidopsis Book - American Society of Plant Biologists*, 1, e0085.

- Riechmann, J. L. (2006). Transcription factors of Arabidopsis and rice: A genomic perspective - Regulation of transcription in plants. *Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK*, 28–53.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., ... Yu, G.-L. (2000). Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499), 2105–2110.
- Riechmann, J. L., Wang, M., Meyerowitz, E. M. (1996). DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Research*, 24(16), 3134–3141.
- Robatzek, S. & Somssich, E. (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & Development*, 16(9), 1139–1149.
- Robert, H. S. & Friml, J. (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology*, 5, 325–332.
- Rock, C. D. & Zeevaert, J. A. D. (1991). The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7496–7499.
- Rodiuc, N., Barlet, X., Hok, S., Perfus-Barbeoch, L., Allasia, V., Engler, G., ... Keller, H. (2016). Evolutionarily distant pathogens require the Arabidopsis phytoalexin signalling pathway to establish disease. *Plant, Cell and Environment*, 39(7), 1396–1407.
- Rojo, E., Sharma, V. K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Fletcher, J. C. (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *The Plant Cell*, 14, 969–977.
- Rombolá-Caldentey, B., Rueda-Romero, P., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., Oñate-Sánchez, L. (2014). Arabidopsis DELLA and two HD-ZIP transcription factors regulate GA signaling in the epidermis through the L1 box cis-element. *The Plant Cell*, 26(7), 2905–2919.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C., Bevan, M. W. (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signaling. *The Plant Journal*, 26(4), 421–433.
- Rossel, J. B., Wilson, P. B., Hussain, D., Woo, N. S., Gordon, M. J., Mewett, O. P., ... Pogson, B. J. (2007). Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(12), 4091–4110.
- Roy, S. (2016). Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant Signaling & Behavior*, 11(1), e1117723.
- Roychoudhury, A., Paul, S., Basu, S. (2013). Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Reports*, 32, 985–1006.
- Ruberti, I., Sessa, G., Lucchetti, S., Morelli, G. (1991). A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *The EMBO Journal*, 10(7), 1787–1791.
- Rueda-Romero, P., Barrero-Sicilia, C., Gómez-Cadenas, A., Carbonero, P., Oñate-Sánchez, L. (2012). *Arabidopsis thaliana* DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14. *Journal of Experimental Botany*, 63(5), 1937–1949.
- Rushton, D. L., Tripathi, P., Rabara, R. C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A. K., ... Rushton, P. J. (1995). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnology Journal*, 10(1), 2–11.

- Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *The EMBO Journal*, *15*, 5690–5700.
- Ryan, C. A. (1974). Assay and biochemical properties of the proteinase inhibitor-inducing factor, a wound hormone. *Plant Physiology*, *54*(3), 328–332.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, *144*(1–2), 112–121.
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M. H., Schroeder, J. I., Serrano, R., Rodriguez, P. L. (2006). Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiology*, *141*(4), 1389–1399.
- Sairam, R. K. & Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, *86*(3), 407–421.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., Mizutani, M. (2004). *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology*, *134*(4), 1439–1449.
- Sakamoto, H., Araki, T., Meshi, T., Iwabuchi, M. (2000). Expression of a subset of the *Arabidopsis* Cys₂/His₂-type zinc-finger protein gene family under water stress. *Gene*, *248*(1-2), 23-32.
- Sakamoto, H., Maruyama, K., Sakuma, Y., Meshi, T., Iwabuchi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). *Arabidopsis* Cys₂/His₂-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology*, *136*(1), 2734–2746.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzeta, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *290*(3), 998–1009.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, *18*(5), 1292–1309.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- San-Bento, R., Farcot, E., Galletti, R., Creff, A., Ingram, G. (2013). Epidermal identity is maintained by cell-cell communication via a universally active feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *77*(1), 46–58.
- Sánchez, J. P., Duque, P., Chua, N. H. (2004). ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *38*(3), 381–395.
- Sanders, G. J. & Arndt, S. K. (2012). Osmotic adjustment under drought conditions - Plant responses to drought stress. *Springer, Berlin, Heidelberg*, 199-229.
- Sauter, A., Dietz, K.-J., Hartung, W. (2002). A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant, Cell and Environment*, *25*(2), 223–228.
- Sauter, M. (2015). Phytosulfokine peptide signalling. *Journal of Experimental Botany*, *66*(17), 5161–5169.
- Schachtmann, D. P. & Goodger, J. Q. (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, *13*, 281–287.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Schlereth, A., Möller, B., Liu, W. L., Kientz, M., Flipse, J., Rademacher, E. H., ... Weijers, D. (2010). MONOPTEROS controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor. *Nature*, 464, 913–916.
- Scholl, R. L., May, S. T., Ware, D. H. (2010). Seed and molecular resources for Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(4), 1477–1480.
- Schrack, K., Nguyen, D., Karlowski, W. M., Mayer, K. F. (2004). START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. *Genome Biology*, 5(6), R41.
- Schwartz, S. H., Qin, X., Zeevaert, J. A. D. (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology*, 131, 1591–1601.
- Scott, M. P. & Carroll, S. B. (1987). The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development. *Cell*, 51(5), 689–698.
- Segarra, G., van der Ent, S., Trillas, I., Pieterse, C. M. J. (2009). MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biology*, 11, 90–96.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G., Yamaguchi, S. (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology*, 69, 463–472.
- Sessa, G., Morelli, G., Ruberti, I. (1997). DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. *Journal of Molecular Biology*, 274(3), 303–309.
- Sessa, G., Steindler, C., Morelli, G., Ruberti, I. (1998). The Arabidopsis *Athb-8*, *-9* and genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant Molecular Biology*, 38(4), 609–622.
- Sevilem, I., Miyashima, S., Helariutta, Y. (2013). Cell-to-cell communication via plasmodesmata in vascular plants. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), 27–32.
- Shabala, S. (2000). Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. *Plant, Cell and Environment*, 23, 825–837.
- Shan, Y., Yan, L., Liu, Z. Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q., ... Zhang, D. P. (2010). The Mg-chelatase H subunit of Arabidopsis antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *The Plant Cell*, 22(6), 1909–1935.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., TZhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331(3), 215–225.
- Sharp, R. E. (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25, 211–222.
- Sharp, R. E. & LeNoble, M. E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 33–37.
- Sharp, R. E., Wu, Y., Voetberg, G. S., Saab, I. N., LeNoble, M. E. (1994). Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany*, 45, 1743–1751.
- Shen, Y. & Diener, A. C. (2013). *Arabidopsis thaliana* resistance to fusarium oxysporum 2 implicates tyrosine-sulfated peptide signaling in susceptibility and resistance to root infection. *PLOS Genetics*, 9(5), e1003525.
- Shen, Y. Y., Wang, X. F., Wu, F. Q., Du, S. Y., Cao, Z., Shang, Y., ... Zhang, D. P. (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*, 443(7113), 823–826.

- Shi, J., Drummond, B. J., Wang, H., Archibald, R. L., Habben, J. E. (2016). Maize and Arabidopsis ARGOS proteins interact with ethylene receptor signaling complex, supporting a regulatory role for ARGOS in ethylene signal transduction. *Plant Physiology*, 171(4), 2783–2797.
- Shi, J., Habben, J. E., Archibald, R. L., Drummond, B. J., Chamberlin, M. A., Williams, R. W., ... Weers, B. P. (2015). Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both Arabidopsis and maize. *Plant Physiology*, 169(1), 266–282.
- Shimada, T., Sugano, S. S., Hara-Nishimura, I. (2011). Positive and negative peptide signals control stomatal density. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2081–2088.
- Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., ... Hakoshima, T. (1997). Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: Flanking base recognition. *The EMBO Journal*, 16, 4689–4697.
- Shinohara, H., Ogawa, E., Sakagami, Y., Matsubayashi, Y. (2007). Identification of ligand binding site of phytosulfokine receptor by on-column photoaffinity labeling. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 124–131.
- Shiu, S.-H., Shih, M.-C., Li, W.-H. (2005). Transcription Factor Families Have Much Higher Expansion Rates in Plants than in Animals. *Plant Physiology*, 139(1), 18–26.
- Shkolnik-Inbar, D. & Bar-Zvi, D. (2010). ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(11), 3560–3573.
- Shlyueva, D., Stampfel, G., Stark, A. (2014). Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nature Reviews. Genetics.*, 15(4), 272–286.
- Shu, K., Liu, X.-d., Xie, Q., He, Z.-h. (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant*, 9(1), 34–45.
- Singh, K. B. (1998). Transcriptional regulation in plants: The importance of combinatorial control. *Plant Physiology*, 118(4), 1111–1120.
- Skinner, M. K., Rawls, A., Wilson-Rawls, J., Roalson, E. H. (2010). Basic helix-loop-helix transcription factor gene family phylogenetics and nomenclature. *Differentiation*, 80, 1–8.
- Skubacz, A. & Daszkowska-Golec, A. (2017). Seed dormancy: the complex process regulated by abscisic acid, gibberellins, and other phytohormones that makes seed germination work - Phytohormones. Signaling mechanisms and crosstalk in plant development and stress responses. *IntechOpen, London*, Kapitel 4.
- Smirnoff, N. & Cumber, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057–1060.
- Soh, M. S., Kim, Y. M., Han, S. J., Song, P. S. (2000). REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12, 2061–2074.
- Song, W., Liu, L., Wang, J., Wu, Z., Zhang, H., Tang, J., ... Chai, J. (2016). Signature motif-guided identification of receptors for peptide hormones essential for root meristem growth. *Cell Research*, 26(2), 674–685.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., Koes, R. (1996). The *no apical meristem* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85, 159–170.
- Spollen, W. G., Sharp, R. E., Saab, I. N., Wu, Y. (1993). Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials - Water deficits. Plant responses from cell to community. *BIOS Scientific Publishers, Oxford*, 37–52.

- Srivastava, R., Liu, J.-X., Howell, S. H. (2008). Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 56(2), 219–227.
- Stahl, Y., Wink, R. H., Ingram, G. C., Simon, R. (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Current Biology*, 19(11), 909–914.
- Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., Thomashow, M. F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 1035–1040.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28(6), 1102–1111.
- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5), 447–456.
- Stührwohldt, N., Dahlke, R. I., Kutschmar, A., Peng, X., Sun, M.-X., Sauter, M. (2014). Phytosulfokine peptide signaling controls pollen tube growth and funicular pollen tube guidance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 153(4), 643–653.
- Stührwohldt, N., Dahlke, R. I., Steffens, B., Johnson, A., Sauter, M. (2011). Phytosulfokine- α Controls Hypocotyl Length and Cell Expansion in *Arabidopsis thaliana* through Phytosulfokine Receptor 1. *PLOS ONE*, 6(6), e21054.
- Sun, J.-Q., Jiang, H.-L., Li, C.-Y. (2011). Systemin/jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato. *Molecular Plant*, 4(4), 607–615.
- Sun, L., Yuan, B., Zhang, M., Wang, L., Cui, M., Wang, Q., Leng, P. (2012). Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *SINCE1* increases both lycopene and β -carotene contents in tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 63, 3097–3108.
- Sun, Z., Gantt, E., Cunningham Jr., F. X. (1996). Cloning and functional analysis of the β -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 24349–24352.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T. Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., ... Huala, E. (2008). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research*, 36, Nucleic Acids Research.
- Swift, J. & Coruzzi, G. (2017). A matter of time - How transient transcription factor interactions create dynamic gene regulatory networks. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860(1), 75–83.
- Szabados, L., Kovács, H., Zilberstein, A., Bouchereau, A. (2011). Plants in extreme environments: Importance of protective compounds in stress tolerance. *Advances in Botanical Research*, 57, 105–150.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., Tasaka, M. (2001). The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development*, 128, 1127–1135.
- Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe, Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., ... Shinozaki, K. (2018). A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. *Nature*, 556(7700), 235–238.
- Takeuchi, J., Ohnishi, T., Okamoto, M., Todoroki, Y. (2015). The selectivity of 6-nor-ABA and 7'-nor-ABA for abscisic acid receptor subtypes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(17), 3507–3510.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, Y., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., ... Ohta, H. (2005). 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and

- plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *139*, 1268–1283.
- Tan, B.-C., Joseph, L. M., Deng, W.-T., Liu, L., Li, Q.-B., Cline, K., McCarty, D. R. (2003). Molecular characterization of the Arabidopsis 9-*cis* epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal*, *35*(1), 44–56.
- Tan, Q. K.-G. & Irish, V. F. (2006). The Arabidopsis zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development. *Plant Physiology*, *140*(3), 1095–1108.
- Tanaka, H., Watanabe, M., Watanabe, D., Tanaka, T., Machida, C., Machida, Y. (2002). *ACR4*, a putative receptor kinase gene of *Arabidopsis thaliana*, that is expressed in the outer cell layers of embryos and plants, is involved in proper embryogenesis. *Plant Cell Physiology*, *43*, 419–428.
- Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., Hasezawa, S. (2005). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *138*, 2337–2343.
- Tasaki, T., Sriram, S. M., Park, K. S., Kwon, Y. T. (2012). The N-end rule pathway. *Annual Review of Biochemistry*, *81*, 261–289.
- Taylor, J. E. & Whitelaw, C. A. (2001). Signals in abscission. *New Phytologist*, *151*, 323–339.
- Thieme, C. J., Rojas-Triana, M., S., E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., ... Kragler, F. (2015). Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nature Plants*, *1*(4), 15025.
- Tian, H., Guo, H., Dai, X., Cheng, Y., Zheng, K., Wang, X., Wang, S. (2015). An ABA down-regulated bHLH transcription repressor gene, *bHLH129* regulates root elongation and ABA response when overexpressed in Arabidopsis. *Nature Scientific Reports*, *5*, 17587.
- Tian, L. & DellaPenna, D. (2001). Characterization of a second carotenoid β -hydroxylase gene from Arabidopsis and its relationship to the LUT1 locus. *Plant Molecular Biology*, *47*(3), 379–388.
- Tian, L., Magallanes-Lundback, M., Musetti, V., DellaPenna, D. (2003). Functional analysis of β - and ϵ -ring carotenoid hydroxylases in Arabidopsis. *Plant Cell*, *15*, 1320–1332.
- Tisné, S., Schmalenbach, I., Reymond, M., Dauzat, M., Pervent, M., Vile, D., Granier, C. (2010). Keep on growing under drought: genetic and developmental bases of the response of rosette area using a recombinant inbred line population. *Plant, Cell and Environment*, *33*, 1875–1887.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M. Y., Yano, M., Nakajima, J., Awazuhara, M., Saito, K. (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal*, *42*(2), 218–235.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Quail, P. H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell*, *15*(8), 1749–1770.
- Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, *14*, 310–317.
- Tran, L. S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to *dehydration stress 1* promoter. *The Plant Cell*, *16*(9), 2481–2498.
- Turner, N. C., Wright, G. C., Siddique, K. H. M. (2001). Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. *Advances in Agronomy*, *71*, 193–231.

- Tuteja, N. (2007). Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 2(3), 135–138.
- Uchida, N., Lee, J. S., Horst, R. J., Lai, H. H., Kajita, R., Kakimoto, T., ... Torii, K. U. (2012). Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6337–6342.
- Ueda, J. & Kato, J. (1982). Identification of jasmonic acid and abscisic acid as senescence-promoting substances from *Cleyera ochracea* DC. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(7), 1975–1976.
- Ülker, B. & Somssich, E. (2002). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 491–498.
- Umemura, Y., Ishiduka, T., Yamamoto, R., Esaka, M. (2004). The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain. *The Plant Journal*, 37(5), 741–749.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., Shinozaki, K. (1993). An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell*, 5, 1529–1539.
- Usadel, B., Bläsing, O. E., Gibon, Y., Retzlaff, K., Höhne, M., Günther, M., Stitt, M. (2008). Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in Arabidopsis rosettes. *Plant Physiology*, 146, 1834–1861.
- Vainonen, J. P., Jaspers, P., Wrzaczek, M., Lamminmäki, A., Reddy, R. A., Vaahtera, L., ... Kangasjärvi, J. (2012). RCD1-DREB2A interaction in leaf senescence and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 442(3), 573–581.
- van Buer, J., Cvetkovic, J., Baier, M. (2016). Cold regulation of plastid ascorbate peroxidases serves as a priming hub controlling ROS signaling in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 16, 163.
- Van den Broeck, L., Dubois, M., Vermeersch, M., Storme, V., Matsui, M., Inzé, D. (2017). From network to phenotype: the dynamic wiring of an Arabidopsis transcriptional network induced by osmotic stress. *Molecular Systems Biology*, 13, 961.
- van der Graaff, E., Dulk-Ras, A. D., Hooykaas, P. J., Keller, B. (2000). Activation tagging of the *LEAFY PETIOLE* gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 127, 4971–4980.
- van der Weele, C. M., Spollen, W. G., Sharp, R. E., Baskin, T. I. (2000). Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1555–1562.
- van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A., Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall- inducing ability. *Nature*, 252, 169–170.
- Van Norman, J. M., Breakfield, N. W., Benfey, P. N. (2011). Intercellular communication during plant development. *The Plant Cell*, 23, 855–864.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., ... van Breusegem, F. (2005). Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in Arabidopsis reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology*, 139(2), 806–821.
- Vandesompele, J., de Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., de Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric

- averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.0031–research0034.0011.
- Vanneste, S., Coppens, F., Lee, E., Donner, T., Xie, Z., Van Isterdael, G., ... Beeckman, T. (2011). Developmental regulation of CYCA2s contributes to tissue-specific proliferation in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 30(16), 3430–3441.
- Vaseva, I. L., Qudeimat, E., Potuschak, T., Du, Y., Genschik, P., Vandenbussche, F., Van der Straeten, D. (2018). The plant hormone ethylene restricts Arabidopsis growth via the epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(17), E4130–E4139.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688–3691.
- Vogel, M. O., Moore, M., König, K., Pecher, P., Alsharafa, K., Lee, J., Dietz, K.-J. (2014). Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(3), 1151–1165.
- Vroemen, C. W., Mordhorst, A. P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M. A. C. J., de Vries, S. C. (2003). The CUP-SHAPED COTYLEDON3 Gene Is Required for Boundary and Shoot Meristem Formation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(7), 1563–1577.
- Wang, B., Sang, Y., Song, J., Gao, X. Q., Zhang, X. (2009a). Expression of a rice *OsARGOS* gene in Arabidopsis promotes cell division and expansion and increases organ size. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 36(1), 31–40.
- Wang, H., Zhu, Y., Fujioka, S., Asami, T., Li, J., Li, J. (2009b). Regulation of Arabidopsis brassinosteroid signaling by atypical basic helix-loop-helix proteins. *The Plant Cell*, 21(12), 3781–3791.
- Wang, H. Z., Yang, K. Z., Zou, J. J., Zhu, L. L., Xie, Z. D., Morita, M. T., Beeckman, T. (2015a). Transcriptional regulation of PIN genes by FOUR LIPS and MYB88 during Arabidopsis root gravitropism. *Nature Communications*, 6, 8822.
- Wang, J., Li, H., Han, Z., Zhang, H., Wang, T., Lin, G., ... Chai, J. (2015b). Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phytosulfokine. *Nature*, 525(7568), 265–268.
- Wang, S. & Chen, J. G. (2008). Arabidopsis transient expression analysis reveals that activation of *GLABRA2* may require concurrent binding of *GLABRA1* and *GLABRA3* to the promoter of *GLABRA2*. *Plant and Cell Physiology*, 49(12), 1792–1804.
- Wang, S., Hubbard, L., Chang, Y., Guo, J., Schiefelbein, J., Chen, J.-G. (2008). Comprehensive analysis of single-repeat R3 MYB proteins in epidermal cell patterning and their transcriptional regulation in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 8, 81.
- Wang, X., Wang, X., Hu, Q., Dai, X., Tian, H., Zheng, K., ... Wang, S. (2015c). Characterization of an activation-tagged mutant uncovers a role of *GLABRA2* in anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 83(2), 300–311.
- Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., ... Mei, L. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology Open*, 7(11), bio035279.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, 410(6826), 380–383.
- Ward, J. M., Cufur, C. A., Denzel, M. A., Neff, M. M. (2005). The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(2), 475–485.

- Wei, P.-C., Tan, F., Gao, X.-Q., Zhang, X.-Q., Wang, G.-Q., Xu, H., ... Wang, X.-C. (2010). Overexpression of *AtDOF4.7*, an Arabidopsis DOF family transcription factor, induces floral organ abscission deficiency in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *153*(3), 1031–1045.
- Weigel, D. (1995). The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain. *The Plant Cell*, *7*, 388–389.
- Whitford, R., Fernandez, A., Tejos, R., Pérez, A. C., Kleine-Vehn, J., Vanneste, S., ... Hilson, P. (2012). GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Developmental Cell*, *22*(3), 678–685.
- Wilkins, O., Nahal, H., Foong, J., Provart, N. J., Campbell, M. M. (2009). Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiology*, *149*, 981–993.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLOS ONE*, *2*(8), e718.
- Wolff, P., Weinhofer, I., Seguin, J., Roszak, P., Beisel, C., Donoghue, M. T. A., ... Köhler, C. (2011). High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the Arabidopsis endosperm. *PLOS Genetics*, *7*(6), e1002126.
- Wu, S. & Gallagher, K. L. (2011). Mobile protein signals in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*, 563–570.
- Wu, T., Kamiya, T., Yumoto, H., Sotta, N., Katsushi, Y., Shigenobu, S., ... Fujiwara, T. (2015). An *Arabidopsis thaliana* copper-sensitive mutant suggests a role of phyto-sulfokine in ethylene production. *Journal of Experimental Botany*, *66*(13), 3657–3667.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., Chua, N.-H. (2000). Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development *Genes & Development*, *14*, 3024–3036
- Xie, Y., Chen, P., Yan, Y., Bao, C., Li, X. G., Wang, L., ... Guan, Q. (2017). An atypical R2R3 MYB transcription factor increases cold hardiness by CBF-dependent and CBF-independent pathways in apple. *New Phytologist*, *218*(1), 201–218.
- Xie, Y., Mao, Y., Lai, D., Zhang, W., Zheng, T., Shen, W. (2013). Roles of NIA/NR/NOA1-dependent nitric oxide production and HY1 expression in the modulation of Arabidopsis salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *64*(10), 3045–3060.
- Xie, Z., Lee, E., Lucas, J. R., Morohashi, K., Li, D., Murray, J. A., ... Grotewold, E. (2010a). Regulation of cell proliferation in the stomatal lineage by the Arabidopsis MYB FOUR LIPS via direct targeting of core cell cycle genes. *The Plant Cell*, *22*, 2306–2321.
- Xie, Z., Li, D., Wang, L., Sack, F. D., Grotewold, E. (2010b). Role of the stomatal development regulators FLP/MYB88 in abiotic stress responses. *The Plant Journal*, *64*, 731–739.
- Xin, Z., Mandaokar, A., Chen, J., Last, R. L., Browse, J. (2007). Arabidopsis *ESK1* encodes a novel regulator of freezing tolerance. *The Plant Journal*, *49*(5), 786–799.
- Xing, D. H., Lai, Z. B., Zheng, Z. Y., Vinod, K. M., Fan, B. F., Chen, Z. X. (2008). Stress- and pathogen-induced Arabidopsis WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Molecular Plant*, *1*(3), 459–470.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., Zhu, J. K. (2001). The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, *13*, 2063–2083.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., Zhu, J.-K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, *14* (Suppl.), S165–S183.

- Xiong, L., Wang, R.-G., Mao, G., Koczan, J. M. (2006a). Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Pathology*, *142*, 1065–1074.
- Xiong, L. & Zhu, J.-K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*, *25*(2), 131–139.
- Xiong, Y. C., Li, F. M., Zhang, T. (2006b). Performance of wheat crops with different chromosome ploidy: root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. *Planta*, *224*(3), 710–718.
- Xu, P., Chen, H., Ying, L., Cai, W. (2016). *AtDOF5.4/OBP4*, a DOF transcription factor gene that negatively regulates cell cycle progression and cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, *6*, 27705.
- Xu, R., Wang, Y., Zheng, H., Lu, W., Wu, C., Huang, J., ... Zheng, C. (2015). Salt-induced transcription factor *MYB74* is regulated by the RNA-directed DNA methylation pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *66*(19), 5997–6008.
- Xu, W., Purugganan, M. M., Polisenksy, D. H., Antosiewicz, D. M., Fry, S. C., Braam, J. (1995). *Arabidopsis TCH4*, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *The Plant Cell*, *71*(1), 1555–1567.
- Xu, Z.-Y., Lee, K. H., Dong, T., Jeong, J. C., Jin, J. B., Kanno, Y., ... Hwang, I. (2012). A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *24*(5), 2184–2199.
- Xu, Z., Wang, M., Shi, D., Zhou, G., Niu, T., Hahn, M. G., ... Kong, Y. (2017). DGE-seq analysis of *MUR3*-related *Arabidopsis* mutants provides insight into how dysfunctional xyloglucan affects cell elongation. *Plant Science*, *258*, 156–169.
- Yadav, S. R., Yan, D., Seville, I., Helariutta, Y. (2014). Plasmodesmata-mediated intercellular signaling during plant growth and development. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 44.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 781–803.
- Yamakawa, S., Sakuta, C., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H., Satoh, S. (1998). The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. *Journal of Plant Research*, *111*, 453–458.
- Yamburenko, M. V., Zubo, Y. O., Börner, T. (2015). Abscisic acid affects transcription of chloroplast genes via protein phosphatase 2C-dependent activation of nucleargenes: repression by guanosine-3'-5'-bisdiphosphate and activation by sigma factor 5. *The Plant Journal*, *82*, 1030–1041.
- Yamburenko, M. V., Zubo, Y. O., Vanková, R., Kusnetsov, V. V., Kulaeva, O. N., Börner, T. (2013). Abscisic acid represses the transcription of chloroplast genes. *Journal of Experimental Botany*, *64*(14), 4491–4502.
- Yanagisawa, S. (2002). The Dof family plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, *7*(12), 555–560.
- Yanagisawa, S. (2004). Dof domain proteins: Plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiology*, *45*(4), 386–391.
- Yanagisawa, S., Akiyama, A., Kisaka, H., Uchimiya, H., Miwa, T. (2004). Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low nitrogen conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 7833–7838.

- Yang, J. C., Zhang, J. H., Wang, Z. Q., Zhu, Q. S., Liu, L. J. (2003). Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant, Cell and Environment*, 26, 1621–1631.
- Yang, K., Wang, H., Xue, S., Qu, X., Zou, J., Le, J. (2014). Requirement for A-type cyclin-dependent kinase and cyclins for the terminal division in the stomatal lineage of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2449–2461.
- Yang, P., Chen, C., Wang, Z., Fan, B., Chen, Z. (1999). A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *The Plant Journal*, 18(2), 141–149.
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A., Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 346, 35–39.
- Yao, Y., He, R. J., Xie, Q. L., Zhao, X. H., Deng, X. M., He, J. B., ... Wu, A. M. (2017). ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74 (ERF74) plays an essential role in controlling a respiratory burst oxidase homolog D (RbohD)-dependent mechanism in response to different stresses in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 213(4), 1667–1681.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., ... Nakashita, H. (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20, 1678–1692.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.
- Yoshida, T., Mogami, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 133–139.
- Yu, L. H., Miao, Z. Q., Qi, G. F., Wu, J., Cai, X. T., Mao, J. L., Xiang, C. B. (2014). MADS-box transcription factor AGL21 regulates lateral root development and responds to multiple external and physiological signals. *Molecular Plant*, 7(11), 1653–1669.
- Yu, L. H., Wu, J., Zhang, Z. S., Miao, Z. Q., Zhao, P. X., Wang, Z., Xiang, C. B. (2017). *Arabidopsis* MADS-box transcription factor AGL21 acts as environmental surveillance of seed germination by regulating *ABI5* expression. *Molecular Plant*, 10(6), 834–845.
- Zeevaart, J. A. D. & Creelman, R. V. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 439–473.
- Zentgraf, U., Laun, T., Miao, Y. (2010). The complex regulation of *WRKY53* during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Cell Biology*, 89(2-3), 133–137.
- Zhang, B., Chen, W., Foley, R. C., Büttner, M., Singh, K. B. (1995). Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. *The Plant Cell*, 7(12), 2241–2252.
- Zhang, F.-P., Sussmilch, F., Nichols, D. S., Cardoso, A. A., Brodribb, T. J., McAdam, S. A. M. (2018a). Leaves, not roots or floral tissue, are the main site of rapid, external pressure-induced ABA biosynthesis in angiosperms. *Journal of Experimental Botany*, 69(5), 1261–1267.
- Zhang, H., Hu, Z., Lei, C., Zheng, C., Wang, J., Shao, S., ... Shi, K. (2018b). A plant phytosulfokine peptide initiates auxin-dependent immunity through cytosolic Ca^{2+} signaling in tomato. *The Plant Cell*, 30, 652–667.

- Zhang, L., Li, Z., Quan, R., Li, G., Wang, R., Huang, R. (2011). An AP2 domain-containing gene, *ESE1*, targeted by the ethylene signaling component EIN3 is important for the salt response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *157*(2), 854–865.
- Zhang, L., Wang, Y., Zhao, L., Shi, S., Zhang, L. (2006). Involvement of nitric oxide in light-mediated greening of barley seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *163*, 818–826.
- Zhang, L. Y., Bai, M. Y., Wu, J., Zhu, J. Y., Wang, H., Zhang, Z., ... Wang, Z. Y. (2009a). Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and Arabidopsis. *The Plant Cell*, *21*(12), 3767–3780.
- Zhang, M., Yuan, B., Leng, P. (2009b). The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, *60*, 1579–1588.
- Zhao, H., Li, X., Ma, L. (2012). Basic helix-loop-helix transcription factors and epidermal cell fate determination in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, *7*, 1556–1560.
- Zhao, Y., Xing, L., Wang, X., Hou, Y.-J., Gao, J., Wang, P., ... Zhu, J.-K. (2014). The ABA receptor PYL8 promotes lateral root growth by enhancing MYB77-dependent transcription of auxin-responsive genes. *Science Signaling*, *7*(328), ra53.
- Zhong, S., Shi, H., Xue, C., Wei, N., Guo, H., Deng, X. W. (2014). Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(11), 3913–3920.
- Zhou, J., Zhang, H., Yang, Y., Zhang, Z., Zhang, H., Hu, X., ... Huang, R. (2008). Abscisic acid regulates TSRF1-mediated resistance to *Ralstonia solanacearum* by modifying the expression of GCC box-containing genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, *59*(3), 645–652.
- Zhou, W., Wei, L., Zhai, Q., Jiang, H., Chen, R., Chen, Q., ... Li, C. (2010). Arabidopsis tyrosylprotein sulfotransferase acts in the auxin/PLETHORA pathway in regulating postembryonic maintenance of the root stem cell niche. *The Plant Cell*, *22*(11), 3692–3709.
- Zhou, X., Hua, D., Chen, Z., Zhou, Z., Gong, Z. (2009). Elongator mediates ABA responses, oxidative stress resistance and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *60*(1), 79–90.
- Zhu, J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *53*, 247–273.
- Zhu, J.-K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, *167*(2), 313–324.
- Zhu, J.-K., Liu, J., Xiong, L. (1998). Genetic analysis of salt tolerance in Arabidopsis: evidence for a critical role of potassium nutrition. *The Plant Cell*, *10*, 1181–1191.
- Zhu, Y., Dong, A., Meyer, D., Pichon, O., Renou, J. P., Cao, K., Shen, W. H. (2006). Arabidopsis *NRP1* and *NRP2* encode histone chaperones and are required for maintaining postembryonic root growth. *The Plant Cell*, *18*(11), 2879–1892.
- Zong, S., Shi, H., Xi, Y., Guo, H. (2010). Ethylene is crucial for cotyledon greening and seedling survival during de-etiolation. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(6), 739–742.
- Zonia, L. & Munnik, T. (2007). Life under pressure: Hydrostatic pressure in cell growth and function. *Trends in Plant Science*, *12*, 90–97.
- Zou, C., Jiang, W., Yu, D. (2010). Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *61*(14), 3901–3914.

Anhang

Tabelle 10: Bezeichnungen der Gene, die Teil dieser Arbeit waren.

Unterstrichen sind die Bezeichnungen, die in dieser Arbeit vornehmlich genutzt wurden. Sortiert nach Genlokus.

Genlokus	Genbezeichnung
At1g08030	<i>TPST</i>
At1g13590	<i>PSK1</i>
At1g21340	<i>DOF1.2</i>
At1g27730	<u><i>STZ</i></u> / <i>ZAT10</i>
At1g30100	<i>NCED5</i>
At1g33280	<u><i>NAC015</i></u> / <i>BRN1</i>
At1g52340	<i>ABA2</i>
At1g52400	<u><i>BG1</i></u> / <i>BGL1</i> / <i>BGLU18</i>
At1g76420	<u><i>NAC031</i></u> / <i>CUC3</i>
At1g78390	<i>NCED9</i>
At2g02220	<i>PSKR1</i>
At2g02820	<i>MYB88</i>
At2g18350	<i>HB24</i> / <i>ZHD6</i>
At2g18490	<i>GAZ</i>
At2g22630	<i>AGL17</i>
At2g22860	<i>PSK2</i>
At2g23030	<i>SNRK2.9</i>
At2g29090	<i>CYP707A2</i>
At2g32860	<i>BG2</i>
At2g40330	<u><i>PYL6</i></u> / <i>RCAR9</i>
At2g43140	<i>bHLH129</i>
At2g44080	<i>ARL</i>
At3g04120	<i>GAPC</i>
At3g14440	<i>NCED3</i>
At3g16770	<i>ERF72</i> / <i>EBP</i> / <u><i>RAP2.3</i></u>

Genlokus	Genbezeichnung
At3g18780	<i>ACTIN2</i>
At3g19270	<i>CYP707A4</i>
At3g21780	<i>UGT71B6</i>
At3g21790	<i>UGT71B7</i>
At3g21800	<i>UGT71B8</i>
At3g24650	<i>ABI3</i>
At3g44735	<i>PSK3</i>
At3g47710	<i>bHLH161</i> / <u><i>BNQ3</i></u> / <i>PRE4</i>
At3g49780	<i>PSK4</i>
At3g59900	<i>ARGOS</i>
At4g01540	<u><i>NAC068</i></u> / <i>NTM1</i>
At4g04890	<i>PDF2</i>
At4g19230	<i>CYP707A1</i>
At4g21750	<i>AtML1</i>
At4g26080	<i>ABI1</i>
At4g33950	<i>SNRK2.6</i> / <i>OST1</i>
At4g37940	<i>AGL21</i>
At5g05410	<i>DREB2A</i>
At5g25190	<i>ERF003</i> / <u><i>ESE3</i></u>
At5g45340	<i>CYP707A3</i>
At5g49520	<i>WRKY48</i>
At5g53890	<i>PSKR2</i>
At5g61600	<i>ERF104</i>
At5g65870	<i>PSK5</i>

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Schnittstellen und Erkennungssequenzen, die zur Klonierung verwendet wurden, sind unterstrichen. Sortiert nach Bezeichnung.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendungszweck / Herkunft / Anmerkung
At1g13590 qF1	CCATCTCCCACCACACATGA	qRT-PCR <i>PSK1</i>
At1g13590 qR1	TCGGTGTGAGCAGCTACTGT	
At1g21340 F1 Sal	<u>ATGTCGACAT</u> GTTGCCGTACATTGGAC	Klonierung 35S: <i>DOF1.2</i>
At1g21340 R1 Xho	AT <u>CTCGAGT</u> CAAATCCCGAACCTGGTAA G	
At1g21340 F2	TTCAGCTCACAGTGCACCTCG	
At1g21340 R2	GACCATCTGGCCGATTCTCG	GK-921E09; T-DNA- Insertionsnachweis
At1g27730 F1 Bam	<u>ATGGATCC</u> ATGGCGCTCGAGGCTC	Klonierung 35S: <i>STZ</i>
At1g27730 R1 Xba	ATT <u>CTAGAT</u> TAAAGTTGAAGTTTGACCG G	
At1g30100 qF1	CGAGGAGAGTTGGGAATCGG	qRT-PCR <i>NCED5</i>
At1g30100 qR1	CCGAATTCACGAAAGTGCCG	
At1g33280 F2	<u>CACCATGAGTTCGTCTAACGGAGG</u>	Klonierung 35S: <i>NAC015</i> (zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*)
At1g33280 R2	TTAAAACAACCCAAGAAATCCATTTTC	
At1g33280 F1	CAGATTGGATCATGCACGAG	
At1g33280 R1	<u>CAACCCAAGAAATCCATTTTCAC</u>	SALK_151986; T-DNA- Insertionsnachweis
At1g52400 qF1	TGCCGAGAATGGATACGGAG	qRT-PCR <i>BG1</i>
At1g52400 qR1	TTGTCCTTGCAAATGGCGTC	
At1g76420 F2	<u>CACCATGATGCTTGCGGTGGAAG</u>	Klonierung 35S: <i>NAC031</i> (zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*)
At1g76420 R2	CTACAGCTGGAATCCTAAAGG	
At1g76420 F1	CTAAGGGACAGGAAATATCCG	
At1g76420 F3	CGGACGAAGAGCTCATTACC	GK-302G09; T-DNA- Insertionsnachweis
At1g78390 F2	ATGCTTATCTGGCTTTAACCGAACCG	SALK_033388; T-DNA- Insertionsnachweis
At1g78390 R2	CAGTTGGATCATTGGACACTTGATC	
At1g78390 F3	AACCCAATTCCTCGACCGAAC	Expressionsanalyse
At1g78390 R3	CTAACACAAAGCTTGCTTCG	
At1g78390 qF1	TAAACCCGGTGCAGAGAACC	
At1g78390 qR1	AGTCCCGGCTATTTGGACG	qRT-PCR <i>NCED9</i>
At2g02820 F2	<u>CACCATGGAAGAGACA</u> ACTAAGCAG	Klonierung 35S: <i>MYB88</i> (zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*)
At2g02820 R2	TTACAAGCTATCGAGAAGGAC	
At2g02820 F1	GCAACCTGATCTCCATGATTC	SALK_068691; T-DNA- Insertionsnachweis
At2g02820 R1	GTTATGCCACCTCCATGAG	
At2g18350 F4 Sal	<u>ATGTCGACGTTTGAAGATTTAGTTT</u> AG	Klonierung 35S: <i>HB24</i>

At2g18350 R4 Xho	TACTCGAGCTTTTCTGATCTTGAAGCTTC	
At2g18350 F3	AGAAGGCACGGTGGAGTCTC	T-DNA-Insertionsnachweis
At2g18350 R3	AACCGATTCACTTCATCATC	
At2g22630 F1 Sal1	AAATTTGTCGACATGGGGAGAGGGAAG ATTG	Klonierung 35S:AGL17
At2g22630 R1 Eco5	AAATTTGATATCTTAGCTGTTTGAAGATG TCTTA	
At2g22630 F2	AGGCAACTAACGGGAGTGG	SALK_140241; T-DNA- Insertionsnachweis
At2g22630 R2	TGATGAACAAGATTCCTCTGC	
At2g22860 qF1	ACTGCTGCCGATCCATGTAA	qRT-RT-PCR <i>PSK2</i>
At2g22860 qR1	GCGACCAAAGTCCTCCTCAT	
At2g23030 F1	GTCGATTTAGCGAAGCTGAG	GK-189B07; T-DNA- Insertionsnachweis
At2g23030 R1	CTTCCGTCGTATTCCGATC	
At2g29090 qF1	GGATCAAAAACGCAACGGCT	qRT-PCR <i>CYP707A2</i> (zur Verfügung gestellt von E. Eysholdt-Derzsó*)
At2g29090 qR1	GCTCCCTGGAGACTTCTTGG	
At2g32860 qF1	ACTGTAAAAAGGTTCGAGGGTGG	qRT-PCR <i>BG2</i>
At2g32860 qR1	TGGTACTCGAGGGATCGTCT	
At2g40330 qF1	ACACTTCGTGAAAAGCTGCC	qRT-PCR <i>PYL6</i>
At2g40330 qR1	CCATGATCTCAAGCCGCTCT	
At2g43140 F1 Bam	ATGGATCCATGTACCCTCCTAATTCCTCT AAG	Klonierung 35S: <i>bHLH129</i>
At2g43140 R1 Xho	ATCTCGAGTCATCGCTTCTTGCATGC	
At2g43140 F2	CGTCAAGCCACCATCTGTCA	SALK_041780; T-DNA- Insertionsnachweis
At2g43140 R2	TACCGTTGGGATCAGTGGGA	
At2g43140 qF1	ATGGACAAGCAAACGAGCTAC	qRT-PCR <i>bHLH129</i>
At2g43140 qR1	CTTCTTGCATGCCCCACAAG	
At2g44080 F1 Bam	ATGGATCCATGATTCGTGAGTTCTCCAG	Klonierung 35S: <i>ARL</i>
At2g44080 R1 Xho	ATCTCGAGTTACATAAAAGTGGAAGAAG AAGAAAC	
At2g44080 R2	CTGATCCAGGTTGTGAGATG	GK-079D09; T-DNA- Insertionsnachweis GK-129B08; T-DNA- Insertionsnachweis
At3g14440 F1	GCTTGCCGGTTTACTCAGAC	
At3g14440 R1	TGTCGTAAACCACCGGAGAC	GK-079D09; T-DNA- Insertionsnachweis
At3g14440 qF1	CCCGCCATTGTTGTTAAGCC	qRT-PCR <i>NCED3</i>
At3g14440 qR1	TGTAGCTTCTCGTGGCTGAC	
At3g19270 qF1	CGAAGCCGAATACATTCATGCC	qRT-PCR <i>CYP707A4</i>
At3g19270 qR2	TCCCTTCACTCCCATCGGAAA	
At3g21780 qF1	TGGGAGGGTTCAGTGAGGAA	qRT-PCR <i>UGT71B6</i>

At3g21780 qR1	AATTCTCCGGGAGGCTCTCT	
At3g21790 qF1	GCCGTTATACGCAGAGCAGA	qRT-PCR <i>UGT71B7</i>
At3g21790 qR1	CAGTAGCCGTCGTAATCCC	
At3g21800 qF1	TTCGGTGTTCTATAGCGCC	qRT-PCR <i>UGT71B8</i>
At3g21800 qR1	CTGATCGCCTCGCCAATACT	
At3g44735 qF1	CTTGTGCCTGGCAGTTCTCT	qRT-PCR <i>PSK3</i>
At3g44735 qR1	ACTGAGTCCTCTTCCACTGATG	
At3g47710 F1 Bam	<u>ATGGATCC</u> ATGTCTAGCAGAAAATCACG TTC	Klonierung 35S: <i>BNQ3</i>
At3g47710 R2 Xho	AT <u>CTCGAG</u> CTACTGCATAAGCAAACCTTCG G	
At3g47710 F ko	ATGTCTAGCAGAAAATCACGTTCAAGAC AA	SALK_098881; T-DNA- Insertionsnachweis (Mara <i>et al.</i> , 2010)
At3g47710 R ko	GTCGTTTTTACGTAGTAAACTGCTCTTGT AATAGAAGT	
At3g47710 F2	ACGAGACGAAAATTTTCTACCG	T-DNA-Insertionsnachweis
At3g47710 R1	TGTGATGGATTTGGTTGGAATG	T-DNA-Insertionsnachweis
At3g47710 F3	AAGACTACTAGTCAGAGTGTTAATC	T-DNA-Insertionsnachweis
At3g49780 qF1	GACAACCACCGCTTTGTCCA	qRT-PCR <i>PSK4</i>
At3g49780 qR1	GGTGTGAAGAACAAGGCTTCG	
At3g59900 F1 Bam	<u>ATGGATCC</u> ATGATTCGAGAAATCTCAA CTTAC	Klonierung 35S: <i>ARGOS</i>
At3g59900 R1 Xho	AT <u>CTCGAG</u> TTACATGAAATTGCAAGTTAC ATCTG	
At3g59900 F2	TCCTCACATTTGTCAGCCCC	T-DNA-Insertionsnachweis
At4g01540 F2	<u>CACCATGATGAAAGG</u> TCTGATTGGG	Klonierung 35S: <i>NAC068</i> (zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*)
At4g01540 R2	TCATAACTTCTTCACCGGGATC	T-DNA-Insertionsnachweis
At4g01540 F3	AGAAATAGACACAAGTCATCAACAC	SALK_019893C; T-DNA- Insertionsnachweis
At4g01540 R1	CTTATGATGAGGCAAGCAAGTG	
At4g04890 F3 Eco1	AT <u>GAAATC</u> ATGTACCATCCAACATGTTT GAG	Klonierung 35S: <i>PDF2</i>
At4g04890 R4 Eco5	AT <u>GATATC</u> TACGCTCCTCCTCCAACATC	
At4g04890 F1	GGATTAAGATCAGAGGCGTC	SALK_109125C; T-DNA- Insertionsnachweis
At4g04890 R1	CTCCATATGCTCTATCCATG	
At4g19230 qF1	GAACCCACTCGTGCCTGG	qRT-PCR <i>CYP707A1</i> (zur Verfügung gestellt von E. Eysholdt-Derzsó*)
At4g19230 qR1	GTTTTGGGGAAGCGCGAATG	
At4g21750 F2	ATGTATCATCCAACATGTTTCG	SALK_033408; T-DNA- Insertionsnachweis
At4g21750 R2	CCTCAAATGTCGCTGCTTC	

At4g33950 F1	CCTCTGATGTCTTGGTGTCCG	GK-516B05; T-DNA-Insertionsnachweis
At4g33950 R1	ACCTGTGGTTGATTATCTCC	
At4g37940 F1	<u>CACC</u> ATGGGAAGAGGGAAGATTGTG	Klonierung 35S:AGL21 (zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*)
At4g37940 R1	TTATTCGTTTGCTCTTGGTGG	
At4g37940 F2	TGTGCCATGCTAATGCATTAC	SALK_775F09; T-DNA-Insertionsnachweis
At4g37940 R2	AAGCATGCAGTTCTTGTCTTAG	
At5g05410 F1	CGTCCCCTATAGGTACGTTG	GK-379F02; T-DNA-Insertionsnachweis
At5g05410 R1	AGCAGCCTCATCATAAGCAG	
At5g05410 qF1	TCGTCCCCTATAGATTGTGTTGT	qRT-PCR <i>DREB2A</i>
At5g05410 qR1	GCCACAGTAGTACCGTCACC	
At5g45340 qF1	CCGTAGCTCCTCCACGAAAC	qRT-PCR <i>CYP707A3</i> (zur Verfügung gestellt von E. Eysholdt-Derzsó*)
At5g45340 qR1	GGGCTCGAGATCATCACACAT	
At5g49520 F2 Bam	<u>ATGGATCC</u> ATGGAGAAGAAAAAGAAGAGG	Klonierung 35S:WRKY48
At5g49520 R2 Xho	AT <u>CTCGAGT</u> CATTTCTTATTCTTTCATTG	
At5g49520 F2	CCTTTTCCTTATTCTTATTTTCG	SALK_066438C; T-DNA-Insertionsnachweis (zur Verfügung gestellt von T. Staffel*)
At5g49520 R2	CTGTTTTTGACAGCTTTTTGGC	
At5g65870 qF1	CTCTGCTCCACGCTAACACA	qRT-PCR <i>PSK5</i>
At5g65870 qR1	TCTTCTCCAACACCTTCACAGA	
ACT2 for	CAAAGACCAGCTCTCCATCG	RT-PCR-Analyse von <i>ACTIN2</i> * als Kontrolle
ACT2 rev	CTGTGAACGATTCTGGACCT	
ACT2 qF1	ACATTCCAGCAGATGTGGATCTC	qRT-PCR <i>ACTIN2</i> (zur Verfügung gestellt von C. Kaufmann*)
ACT2 qR1	GATCCCATTCTATAAAACCCCAGC	
CB13-for	GTTTCGCTCAAGAGGGAGATCA	qRT-PCR <i>PSKR1</i> (zur Verfügung gestellt von C. Kaufmann*)
CB13-rev	CCGGTGCCCGTGTGTTGTAT	
CB19-for	AGCGAGGTTTTCGATCCGTT	qRT-PCR <i>PSKR2</i> (zur Verfügung gestellt von C. Kaufmann*)
CB19-rev	CTGTTGAGTCGTTGGCCTCT	
CB73-for	GTTTCGGAGTTGTGCTTCTCGAG	<i>PSKR1</i> Expression (zur Verfügung gestellt von C. Kaufmann*)
CB73-rev	CCAAGAGACTAACTGTTGAGTCGTTG	
GAPC qF1	GATTCTACAATGGCTGACAAGAAGA	qRT-PCR <i>GAPC</i> (zur Verfügung gestellt von C. Kaufmann*)
GAPC qR1	ATGAAGGGGTCGTTGACAGC	
GK LB 8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	GABI-KAT-Linien T-DNA-

pENTR 1A DualFor	GTTAGTACTTAAGCTCGGGC	Insertions-nachweis* Sequenzierung*
SALK LBb1	ACCGCTTGCTGCAACTCTC	SALK-Linien T-DNA- Insertionsnachweis*

*AG Sauter, CAU Kiel, Deutschland

Tabelle 12: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete Vektorkonstrukte.

Daten sortiert nach Genlokus. pB7WG2.0 (Karimi *et al.*, 2002), pENTR1a DS: Gateway™ pENTR™1a Dual Selection Vector (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), pENTR TOPO: pENTR™ Directional TOPO® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Vektorkonstrukt	Vektor	Genlokus	Herkunft
<i>pENTR1A 35S:DOF1.2</i>	pENTR1a DS	At1g21340	diese Arbeit
<i>pB7WG2 35S:DOF1.2</i>	pB7WG2.0	At1g21340	diese Arbeit
<i>pENTR1A 35S:STZ</i>	pENTR1a DS	At1g27730	diese Arbeit
<i>pB7WG2 35S:STZ</i>	pB7WG2.0	At1g27730	diese Arbeit
<i>TOPO 35S:NAC015</i>	pENTR TOPO	At1g33280	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>pB7WG2 35S:NAC015</i>	pB7WG2.0	At1g33280	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>TOPO 35S:NAC031</i>	pENTR TOPO	At1g76420	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>pB7WG2 35S:NAC031</i>	pB7WG2.0	At1g76420	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>TOPO 35S:MYB88</i>	pENTR TOPO	At2g02820	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>pB7WG2 35S:MYB88</i>	pB7WG2.0	At2g02820	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>pB7WG2 35S:RAP2.3</i>	pB7WG2.0	At3g16770	zur Verfügung gestellt von E. Eysholdt-Derzsó*
<i>pENTR1A 35S:HB24</i>	pENTR1a DS	At2g18350	diese Arbeit
<i>pB7WG2 35S:HB24</i>	pB7WG2.0	At2g18350	diese Arbeit
<i>pENTR1A 35S:AGL17</i>	pENTR1a DS	At2g22630	diese Arbeit
<i>pB7WG2 35S:AGL17</i>	pB7WG2.0	At2g22630	diese Arbeit
<i>pENTR1A 35S:bHLH129</i>	pENTR1a DS	At2g43140	diese Arbeit
<i>pB7WG2 35S:bHLH129</i>	pB7WG2.0	At2g43140	diese Arbeit
<i>pENTR1A 35S:ARL</i>	pENTR1a DS	At2g44080	diese Arbeit
<i>pB7WG2 35S:ARL</i>	pB7WG2.0	At2g44080	diese Arbeit
<i>pENTR1A 35S:BNQ3</i>	pENTR1a DS	At3g47710	diese Arbeit
<i>pB7WG2 35S:BNQ3</i>	pB7WG2.0	At3g47710	diese Arbeit
<i>pENTR1A 35S:ARGOS</i>	pENTR1a DS	At3g59900	diese Arbeit
<i>pB7WG2 35S:ARGOS</i>	pB7WG2.0	At3g59900	diese Arbeit
<i>TOPO 35S:NAC068</i>	pENTR TOPO	At4g01540	zur Verfügung gestellt von

			N. Stührwohldt*
<i>pB7WG2 35S:NAC068</i>	pB7WG2.0	At4g01540	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>pENTR1A 35S:PDF2</i>	pENTR1a DS	At4g04890	diese Arbeit
<i>pB7WG2 35S:PDF2</i>	pB7WG2.0	At4g04890	diese Arbeit
<i>TOPO 35S:AGL21</i>	pENTR TOPO	At4g37940	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>pB7WG2 35S:AGL21</i>	pB7WG2.0	At4g37940	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>pENTR1A 35S:WRKY48</i>	pENTR1a DS	At5g49520	zur Verfügung gestellt von T. Urbanski*
<i>pB7WG2 35S:WRKY48</i>	pB7WG2.0	At5g49520	zur Verfügung gestellt von T. Urbanski*

*AG Sauter, CAU Kiel, Deutschland

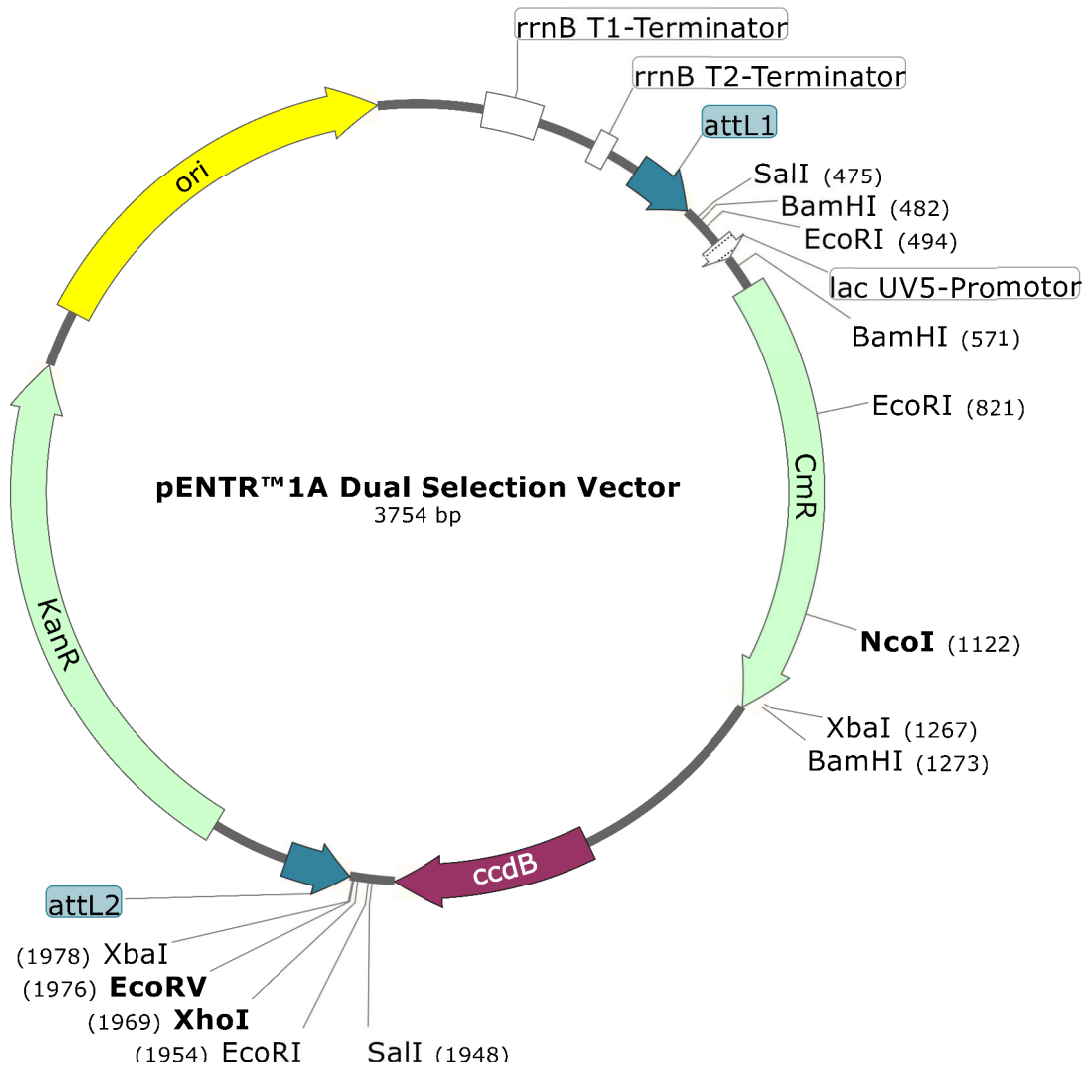


Abbildung 59: Vektorkarte des „pENTR™ 1a Dual Selection Vector“ für Gateway™-Klonierungen.

kanR: Kanamycinresistenz; ori: Replikationsbeginn (origin of replication); rrnB T1-Terminator: T1-Terminator des rrnB Gens aus E. coli; attL1/attL2: Interaktionsort für Rekombination (mit attR1/attR2); lac UV5-Promotor: Promotor des lac-Operons aus E. coli; CmrR: Chloramphenicolresistenz; ccdB: Gen für toxische Komponente eine Toxin-Antitoxin-Komplexes. Zur Klonierung verwendete Schnittstellen eingezeichnet, Mehrfachschnittstellen dick gedruckt. Abbildung erstellt mit SnapGene® (GSL Biotech LLC, Chicago, USA).

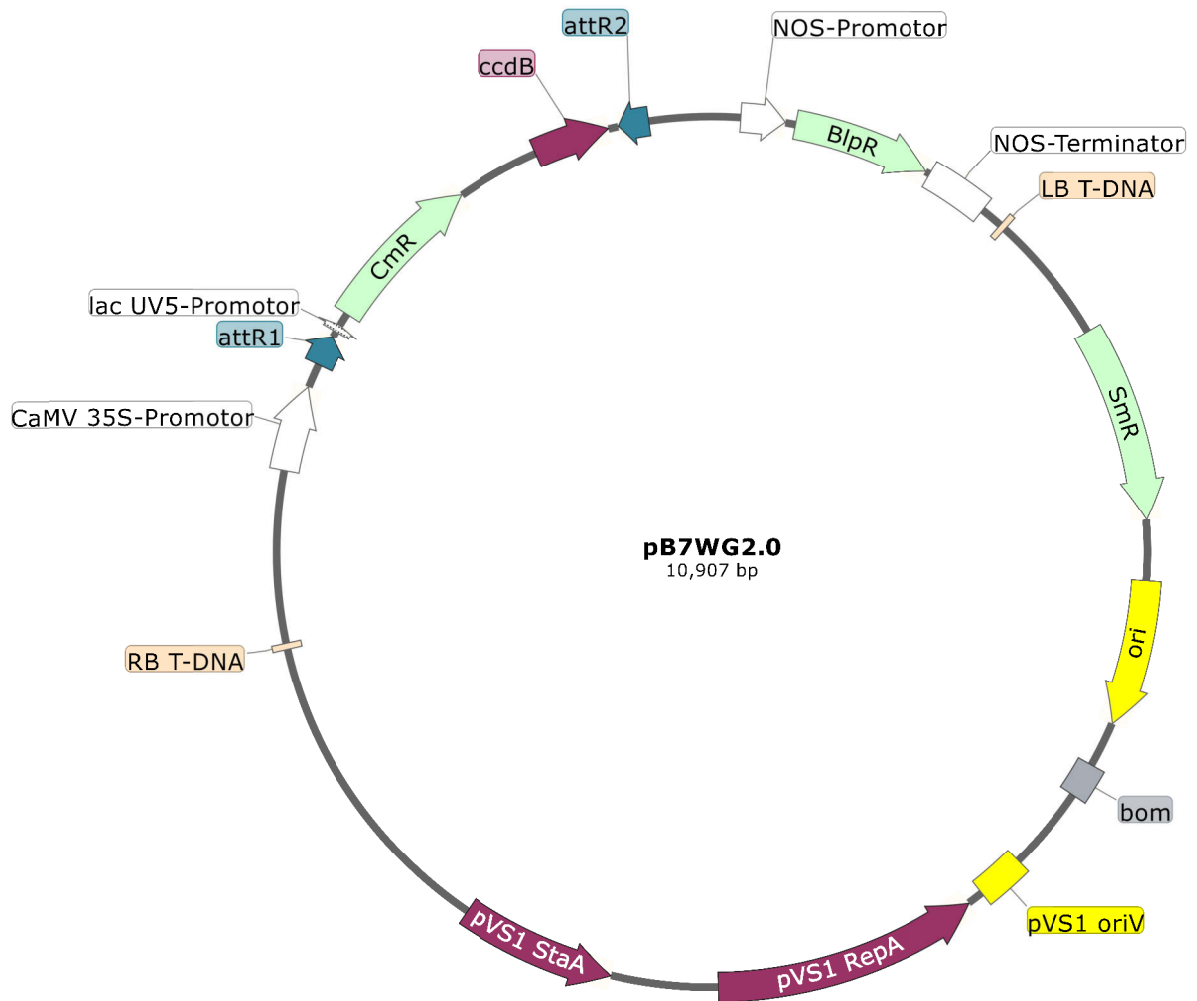


Abbildung 60: Vektorkarte des „pB7WG2.0“ für Gateway™-Klonierungen.

RB T-DNA/LB T-DNA: T-DNA-flankierende Tandemsequenzen (*right border/left border*); CaMV 35S-Promotor: Promotor aus dem Blumenkohl Mosaik Virus (*Cauliflower Mosaic Virus*); attR1/attR2: Interaktionsort für Rekombination (mit attL1/attL2); lac UV5-Promotor: Promotor des lac Operons aus *E. coli*; CmR: Chloramphenicolresistenz; ccdB: Gen für toxische Komponente eine Toxin-Antitoxin-Komplexes; NOS-Promotor: Nopalinsynthase-Promotor; BlpR: Bialaphosresistenz (BASTA®-Resistenz); NOS-Terminator: Nopalinsynthase-Terminator; SmR: Streptomycinresistenz; ori: Replikationsanfangsort (*origin of replication*); bom: Transferanfangsort/Mobilitätsgen (*basis of mobility*); pVS1 oriV: Beginn vegetativer Replikation (*origin of vegetative replication*) pVS1 RepA: pVS1 StaA: Abbildung erstellt mit SnapGene® (GSL Biotech LLC, Chicago, USA).

Tabelle 13: In dieser Arbeit untersuchte T-DNA-Insertionslinien.

Daten sortiert nach Genloкус.

T-DNA-Insertionslinie/ NASC-Identifikationsnummer	Genloкус	Genbezeichnung	Bezeichnung; Herkunft / Anmerkung
SALK_009847	At1g08030	<i>TPST</i>	<i>tpst-1</i> ; Komori <i>et al.</i> (2009)
GK-921E09 / N488377	At1g21340	<i>AtDof1.2</i>	diese Arbeit, kein ko
SALK_054092 / N666063	At1g27730	<i>STZ / ZAT10</i>	<i>KO-Zat10</i> ; Mittler <i>et al.</i> (2006)
SALK_151986C / N667631	At1g33280	<i>NAC015 / BRN1</i>	<i>brn1-1</i> ; Bennett <i>et al.</i> (2010)
<i>aba2-1</i> / N156	At1g52340	<i>ABA2</i>	<i>aba2-1</i> ; Rook <i>et al.</i> (2001)
GK-302G09 / N428977	At1g76420	<i>NAC031 / CUC3</i>	<i>cuc3-105</i> ; Hibara <i>et al.</i> (2006)
SALK_033388 / N533388	At1g78390	<i>NCED9</i>	<i>nced9-1</i> ; Frey <i>et al.</i> (2012)
SALK_008585	At2g02220	<i>PSKR1</i>	<i>pskr1-3 (Atpskr1-T)</i> ; Kutschmar <i>et al.</i> (2009); Stührwohldt <i>et al.</i> (2011)
-	At2g02220, At5g53890	<i>PSKR1, PSKR2</i>	<i>pskr1-3 pskr2-1</i> ; Stührwohldt <i>et al.</i> (2011); Hartmann <i>et al.</i> (2013)
SALK_068691 / N568691	At2g02820	<i>MYB88</i>	<i>myb88</i> (SALK_068691); Lai <i>et al.</i> (2005)
SALK_200630C / N687811	At2g18350	<i>HB24 / ZHD6</i>	<i>hb24-1</i> ; diese Arbeit, Amplifikation nicht möglich
SALK_140241 / N640241	At2g22630	<i>AGL17</i>	<i>agl17-1</i> ; Han <i>et al.</i> (2008)
-	At2g22630, At4g37940	<i>AGL17, AGL21</i>	<i>agl17-1 agl21-3</i> ; diese Arbeit
GK-189B07 / N418067	At2g23030	<i>SNRK2.9</i>	<i>snRK2.9-1</i> ; diese Arbeit
-	At2g29090, At5g45340	<i>CYP707A2, CYP707A3</i>	<i>cyp707a2-1 cyp707a3-1</i> ; Okamoto <i>et al.</i> (2006)
SAIL_1179_D01 / N878408	At2g40330	<i>PYL6</i>	<i>pyl6</i> ; Antoni <i>et al.</i> (2013)
SALK_041780 / N685737	At2g43140	<i>bHLH129</i>	<i>bhlh129-1</i> ; Tian <i>et al.</i> (2015)

GK-079D09 / N407533	At2g44080	ARL	diese Arbeit, kein ko
-	At3g14230, At3g16770, At1g53910, At1g72360, At2g47520	RAP2.2, RAP2.3, RAP2.12, HRE1, HRE2	erfVII; Abbas et al. (2015)
GK-129B08 / N412308	At3g14440	NCED3	nced3; Guo et al. (2009)
WiscDsLox247E11 / N849696	At3g16770	RAP2.3 / ERF72 / EBP	rap2.3-2; Marín-de la Rosa et al. (2014)
SALK_138922C / N667134	At3g24650	ABI3	abi3; Kotak et al. (2001)
SALK_098881 / N598881	At3g47710	BNQ3 / bHLH161 / PRE4	bnq3; Mara et al. (2010), nicht bestätigt
SAIL_896_G10 / N877831	At3g59900	ARGOS	argos-1; Feng et al. (2011), nicht bestätigt
SALK_019893C / N661715	At4g01540	NAC068 / NTM1	diese Arbeit, kein ko
SALK_109425C / N663634	At4g04890	PDF2	pdf2-2; San-Bento et al. (2013)
SALK_069127 / N569127	At4g19230	CYP707A1	cyp707a1-1; Okamoto et al. (2006)
-	At4g19230, At2g29090	CYP707A1, CYP707A2	cyp707a1-1 cyp707a2-1; Okamoto et al. (2006)
SALK_033408 / N533408	At4g21750	AtML1	atml1-3; Ogawa et al. (2015)
SALK_072009 / N859686	At4g26080	ABI1	abi1-2; Saez et al. (2006)
GK-516B05 / N449457	At4g33950	OST1 / SNRK2.6	ost1-4; Ding et al. (2015a)
GK-775F09 / N474373	At4g37940	AGL21	agl21-3; diese Arbeit
GK-379F02 / N436350	At5g05410	DREB2A	dreb2a-1; Vainonen et al. (2012)
SALK_066438 / N666292	At5g49520	WRKY48	wrky48-1; Xing et al. (2008)
SALK_024464	At5g53890	PSKR2	pskr2-1 (Atpskr2); Amano et al. (2007); Stührwohldt et al. (2011)

Tabelle 14: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Überexpressionslinien.

Alle den Linien zu Grunde liegenden Konstrukte verfügen über eine BASTA®-Resistenz. Sortiert nach genetischem Hintergrund und Bezeichnung.

Bezeichnung	Genetischer Hintergrund	Vektor-konstrukt	Bezeichnung; Herkunft / Anmerkung
GAZ SRDX	Col-0	-	Lee <i>et al.</i> (2016)
GAZox #4 / #5 / #10		-	Lee <i>et al.</i> (2016)
35S:AGL17-1 / -2 / -3 / -4 / -5 / -6		35S:AGL17	diese Arbeit
35S:AGL21-1 / -2 / -5 / -6		35S:AGL21	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
35S:ARGOS-1 / -2 / -3 / -4 / -5 / -6 / -7 / -8 / -9 / -10 / -11		35S:ARGOS	diese Arbeit
35S:ARL-1 / -2 / -6 / -7 / -8 / -9 / -10		35S:ARL	diese Arbeit
35S:bHLH129-1 / -2 / -3 / -5 / -6 / -8 / -9 / -10 / -11		35S:bHLH129	diese Arbeit
35S:BNQ3-1 / -2 / -4 / -5 / -8		35S:BNQ3	diese Arbeit
35S:DOF1.2-1 / -2 / -3 / -4 / -6 / -8 / -9		35S:DOF1.2	diese Arbeit
35S:HB24-2 / -4 / -5 / -6 / -7 / -10 / -11		35S:HB24	diese Arbeit
35S:MYB88-2 / -3 / -6		35S:MYB88	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
35S:NAC015-1 / -2 / -3		35S:NAC015	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
35S:NAC031-1 / -4 / -5 / -6		35S:NAC031	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
35S:NAC068-1 / -3 / -4 / -5		35S:NAC068	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
35S:PDF2-1 / -4 / -5 / -9		35S:PDF2	diese Arbeit
35S:PSKR1-2 / -12		-	PSKR1ox2 / PSKR1ox12; Hartmann <i>et al.</i> (2013)
35S:PSKR1-GFP-1		-	35S:PSKR1-GFP; Hartmann <i>et al.</i> (2015)
35S:RAP2.3-1 / -3 / -4		-	zur Verfügung gestellt von E. Eysholdt-Derzsó*
35S:STZ		35S:STZ	diese Arbeit, Transformation nicht erfolgreich
35S:WRKY48(-1 / -2 / -3 / -4 / -5		35S:WRKY48	diese Arbeit, Selektion

/-6/-7/-8)			nicht abgeschlossen
<i>tpst-1 35S:AGL17-2 / -4 / -5 / -7 / -8 / -11</i>	<i>tpst-1</i>	<i>35S:AGL17</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:AGL21-2 / -3 / -5 / -6</i>		<i>35S:AGL21</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:ARGOS-2 / -3 / -5</i>		<i>35S:ARGOS</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:ARL-1 / -5 / -7</i>		<i>35S:ARL</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:bHLH129-1 / -3</i>		<i>35S:bHLH129</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:BNQ3-1 / -2 / -3</i>		<i>35S:BNQ3</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:DOF1.2-3 / -6 / -7</i>		<i>35S:DOF1.2</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:HB24-1 / -2 / -3 / -4 / -5</i>		<i>35S:HB24</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:MYB88</i>		<i>35S:MYB88</i>	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*, keine Homozygotie erreicht
<i>tpst-1 35S:NAC015-1</i>		<i>35S:NAC015</i>	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>tpst-1 35S:NAC031-1 / -3</i>		<i>35S:NAC031</i>	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>tpst-1 35S:NAC068-3 / -4</i>		<i>35S:NAC068</i>	zur Verfügung gestellt von N. Stührwohldt*
<i>tpst-1 35S:PDF2-1 / -2 / -3</i>		<i>35S:PDF2</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:STZ-1 / -2 / -3</i>		<i>35S:STZ</i>	diese Arbeit
<i>tpst-1 35S:WRKY48(-1)</i>	<i>35S:WRKY48</i>	zur Verfügung gestellt von T. Urbanski*, Selektion nicht abgeschlossen	

*AG Sauter, CAU Kiel, Deutschland

Tabelle 15: In dieser Arbeit verwendete Reportergenkonstruktlinien.

Sortiert nach Genbezeichnung.

Reportergen-konstruktlinie	Genlokus	Genbezeichnung	Veröffentlichung, Kommentar
<i>PSK1:GUS-3</i>	At1g13590	<i>PSK1</i>	Kutschmar <i>et al.</i> (2009); Stührwohldt <i>et al.</i> (2011)
<i>PSK2:GUS-2</i>	At2g22860	<i>PSK2</i>	Kutschmar <i>et al.</i> (2009); Stührwohldt <i>et al.</i> (2011)
<i>PSK3:GUS-3</i>	At3g44735	<i>PSK3</i>	Kutschmar <i>et al.</i> (2009); Stührwohldt <i>et al.</i> (2011)
<i>PSK4:GUS-4</i>	At3g49780	<i>PSK4</i>	Kutschmar <i>et al.</i> (2009); Stührwohldt <i>et al.</i> (2011)
<i>PSK5:GUS-1</i>	At5g65870	<i>PSK5</i>	Kutschmar <i>et al.</i> (2009); Stührwohldt <i>et al.</i> (2011)
<i>PSKR1:GUS-3</i>	At2g02220	<i>PSKR1</i>	unveröffentlicht (zur Verfügung gestellt von M. Sauter*)
<i>PSKR1:GUS-4</i>			Kutschmar <i>et al.</i> (2009); Stührwohldt <i>et al.</i> (2011)
<i>PSKR2:GUS-3</i>	At5g53890	<i>PSKR2</i>	Stührwohldt <i>et al.</i> (2014)

*AG Sauter, CAU Kiel, Deutschland

zu Kapitel 3.1.1

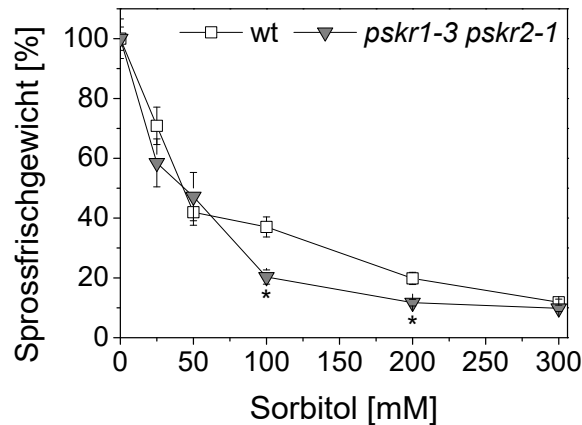


Abbildung 61: PSKR1 vermitteln verstärkte Resistenz gegen osmotischen Stress.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit verschiedenen Konzentrationen von Sorbitol versetzt worden war und nach weiteren 21 Tagen Anzucht analysiert. Es wurde *pskr1-3 pskr2-1* im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Sprossfrischgewicht (\pm SE) von *pskr1-3 pskr2-1* bei Sorbitolbehandlung, gezeigt als prozentualer Anteil der unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen, deren Wert auf 100% gesetzt wurde. Asteriske zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *pskr1-3 pskr2-1* bei derselben Behandlung an (Mann-Whitney *U* Test, $p < 0,05$, 3 unabhängige Experimente, $n \geq 18$).

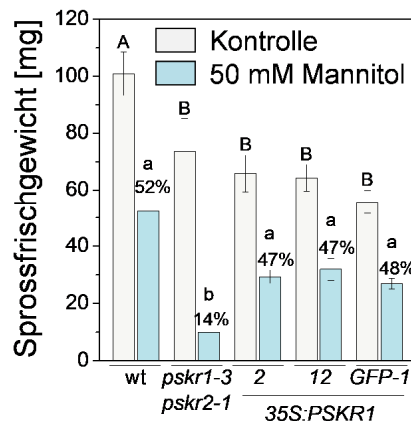


Abbildung 62: PSKR1-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Wachstumsveränderung des Sprosses in Antwort auf Mannitol.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war und nach weiteren 21 Tagen Anzucht analysiert. Es wurden die Überexpressionslinien 35S:PSKR1-2, -12 und 35S:PSKR1-GFP-1 im Vergleich zu Wildtyp- und *pskr1-3 pskr2-1*-Pflanzen analysiert. Sprossfrischgewicht (\pm SE) bei Mannitolbehandlung, Großbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Sprossfrischgewichts unter Kontrollbedingungen. Bei der Mannitolbehandlung erzielte Daten wurden als prozentualer Anteil des Sprossfrischgewichts der jeweiligen Linie unter Kontrollbedingungen berechnet und die statistischen Unterschiede mit Kleinbuchstaben dargestellt (Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$, zwei Experimente, $n \geq 12$).

zu Kapitel 3.1.2

Tabelle 16: Expressionsdaten PSK-regulierter Gene unter osmotischen Stressbedingungen und in Antwort auf ABA.

Aufgeführt sind Expressionsdaten der PSK-Rezeptor- und der PSK-Gene sowie der in dieser Arbeit untersuchten PSK-regulierten Gene bei osmotischem Stress und in Antwort auf ABA, entnommen aus der Datenbank Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008), dargestellt als log2 der Signalwerte. Kontrollbedingungen (K) gegenüber der jeweiligen Behandlung (B). Für *NAC068* und *BNQ3* existieren keine Expressionsdaten in der Datenbank. blau: stärker exprimiert, orange: schwächer exprimiert, grau: mittelstark exprimiert. osmotischer Stress Spross: experimentelle ID AT-00120 (16 Tage alte Pflanzen, für 24 Stunden behandelt mit 300 mM Mannitol, Sprossgewebe verwendet, 2 Experimente); osmotischer Stress Wurzel: experimentelle ID AT-00120 (16 Tage alte Pflanzen, für 24 Stunden behandelt mit 300 mM Mannitol, Wurzeln verwendet, 2 Experimente); ABA: experimentelle ID AT-00420 (14 Tage alte Pflanzen, für 4 Stunden behandelt mit 100 µM ABA, gesamte Pflanze verwendet, 3 Experimente).

Familie	Gen-bezeichnung	Genlokus	osmotischer Stress Spross		osmotischer Stress Wurzel		ABA		log2 des Signalwertes
			K	B	K	B	K	B	
PSKR	<i>PSKR1</i>	At2g02220	9,3	10,6	11,5	11,8	10,8	11,1	17,0
	<i>PSKR2</i>	At5g53890	10,2	10,6	11,1	10,7	10,5	10,2	16,0
PSK	<i>PSK1</i>	At1g13590	7,6	7,7	10,7	9,6	8,8	8,8	15,0
	<i>PSK2</i>	At2g22860	7,2	9,0	8,9	10,9	10,4	9,6	14,0
	<i>PSK3</i>	At3g44735	11,2	11,2	12,9	10,8	12,2	12,9	13,0
	<i>PSK4</i>	At3g49780	9,6	11,1	12,3	12,7	13,5	11,8	12,0
	<i>PSK5</i>	At5g65870	10,8	12,0	9,8	10,8	11,7	11,6	11,0
MADS-Box	<i>AGL17</i>	At2g22630	7,4	7,3	7,9	8,1	7,4	7,5	10,0
	<i>AGL21</i>	At4g37940	7,2	7,3	9,6	10,1	9,0	9,0	9,0
ERF/AP2	<i>RAP2.3</i>	At3g16770	13,1	12,9	12,2	13,4	16,2	15,8	8,0
	<i>ESE3</i>	At5g25190	9,9	8,7	8,4	8,4	9,5	8,9	7,0
	<i>ERF104</i>	At5g61600	9,3	10,9	11,1	11,6	10,6	10,5	6,0
HD	<i>HB24</i>	At2g18350	7,9	9,3	8,1	8,3	8,6	9,2	
	<i>PDF2</i>	At4g04890	12,7	11,9	11,0	9,8	11,5	11,1	
Zinkfinger	<i>DOF1.2</i>	At1g21340	7,9	7,9	7,8	7,9	7,6	7,8	
	<i>STZ</i>	At1g27730	9,2	13,1	11,4	13,0	10,2	12,0	
	<i>GAZ</i>	At2g18490	6,9	7,0	6,8	6,9	7,3	7,3	
	<i>WRKY48</i>	At5g49520	8,4	9,8	10,9	11,5	9,3	10,8	
NAC	<i>NAC015</i>	At1g33280	7,8	8,0	9,1	8,5	7,5	7,6	
	<i>NAC031</i>	At1g76420	7,6	7,7	7,3	7,4	7,5	7,4	
andere	<i>MYB88</i>	At2g02820	7,7	6,9	7,9	8,1	7,7	7,5	
	<i>bHLH129</i>	At2g43140	7,3	7,1	10,4	7,7	8,1	7,3	

zu Kapitel 3.1.4

Tabelle 17: Durch sulfatierte Peptide regulierte Gene.

Ergebnisse eines Microarrays (M. Sauter, unveröffentlicht), in dem Wurzeln fünf Tage alter Wildtyp- und *tpst-1*-Keimlinge, mit oder ohne PSK-Behandlung, als Material dienten. Ein Ergebnis wurde als Induktion (blau) bei einem Wert ≥ 2 , und als Repression (orange) bei einem Wert $\leq 0,5$ gewertet.

Genlokus	Genbezeichnung	Relative Expression		
		<i>tpst-1</i> /wt	<i>tpst-1</i> +PSK/wt	<i>tpst-1</i> +PSK/ <i>tpst-1</i>
At1g65570	<i>RCPG</i>	4,26	1,38	0,32
At5g05410	<i>DREB2A/DREB2</i>	0,45	0,41	0,91
At2g40330	<i>PYL6/RCAR9</i>	1,21	0,47	0,39

zu Kapitel 3.1.6

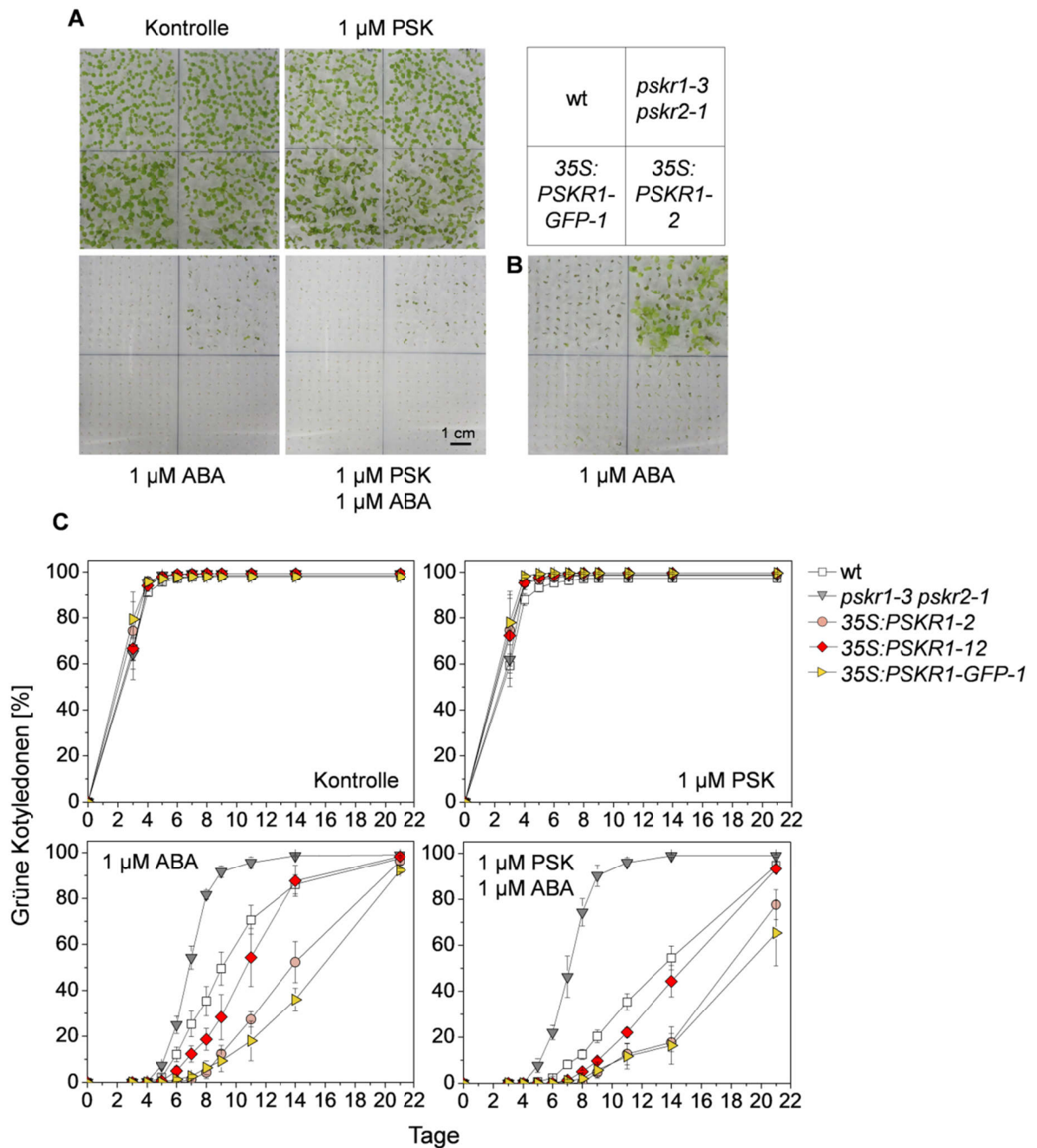


Abbildung 63: Abwesenheit der PSK-Rezeptoren bewirkt verfrühtes Ergrünen der Kotyledonen in Antwort auf ABA.

Analyse des Ergrünen der Kotyledonen in Antwort auf ABA und PSK. Werte sind Mittelwerte (\pm SE), $n = 3$, 3 unabhängige Experimente, die jeweils das Ergrünen von 100 Keimlingen auswerten. Keimlinge mit grünen ausgebreiteten Kotyledonen wurden gezählt.

A Phänotyp sieben Tage nach Stratifizierung,

B Phänotyp 14 Tage nach Stratifizierung,

C Entwicklung grüner Kotyledonen in Anwesenheit von ABA und PSK über 21 Tage nach Stratifizierung.

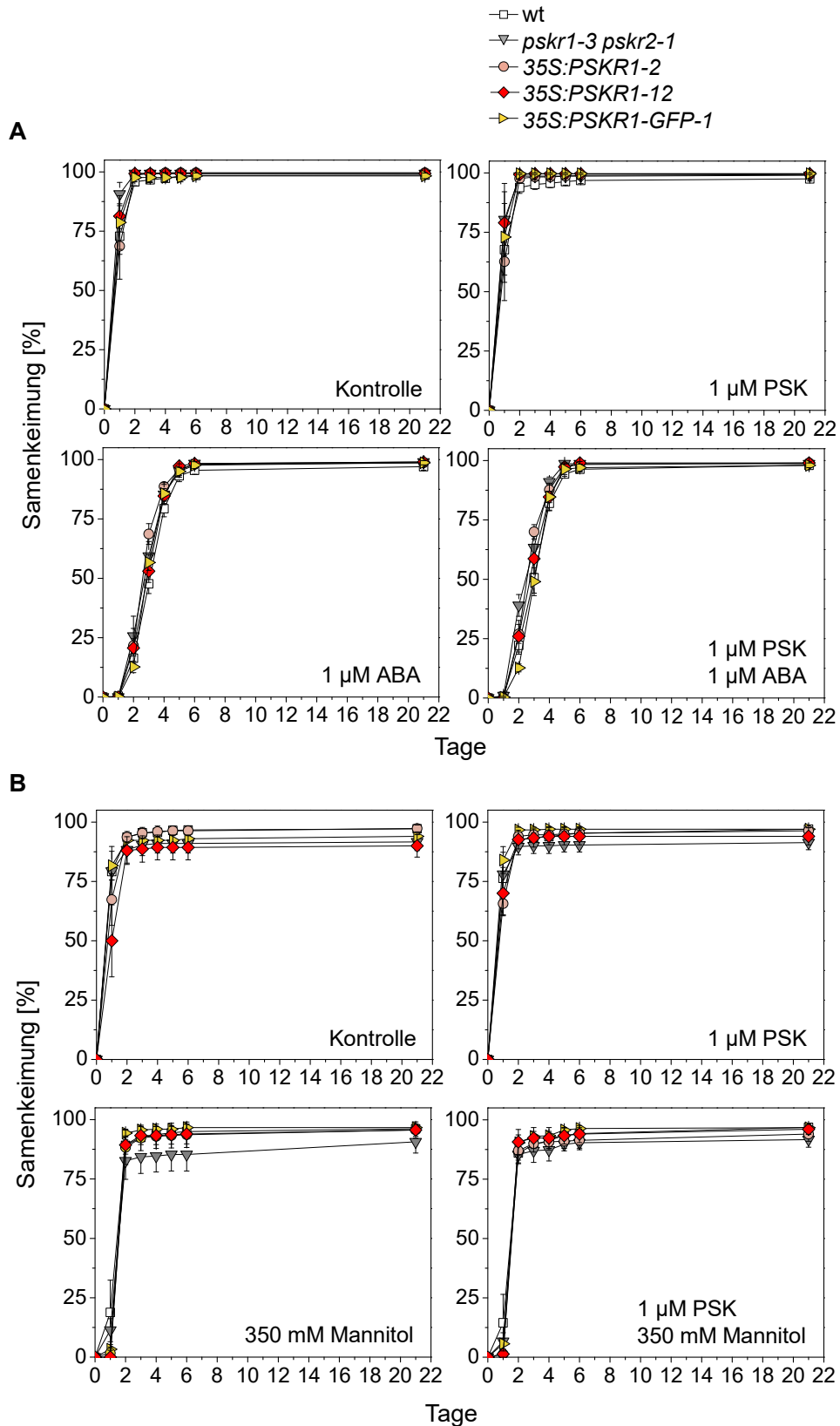


Abbildung 64: PSKRs regulieren nicht die durch ABA und osmotischen Stress hervorgerufene Verzögerung der Keimung.

Analyse der Keimungsrate in Antwort auf ABA-, Mannitol- und PSK-Behandlung. Werte sind Mittelwerte (\pm SE), $n = 3$, drei unabhängige Experimente, bei denen jeweils 100 Samen ausgewertet wurden. Samen mit durch den Keimling sowohl penetrierter Testa als auch Endosperm wurden als Keimungsvorgang gewertet.

A Saatgut behandelt mit oder ohne 1 μ M ABA und/oder 1 μ M PSK.

B Saatgut behandelt mit oder ohne 350 mM Mannitol und/oder 1 μ M PSK.

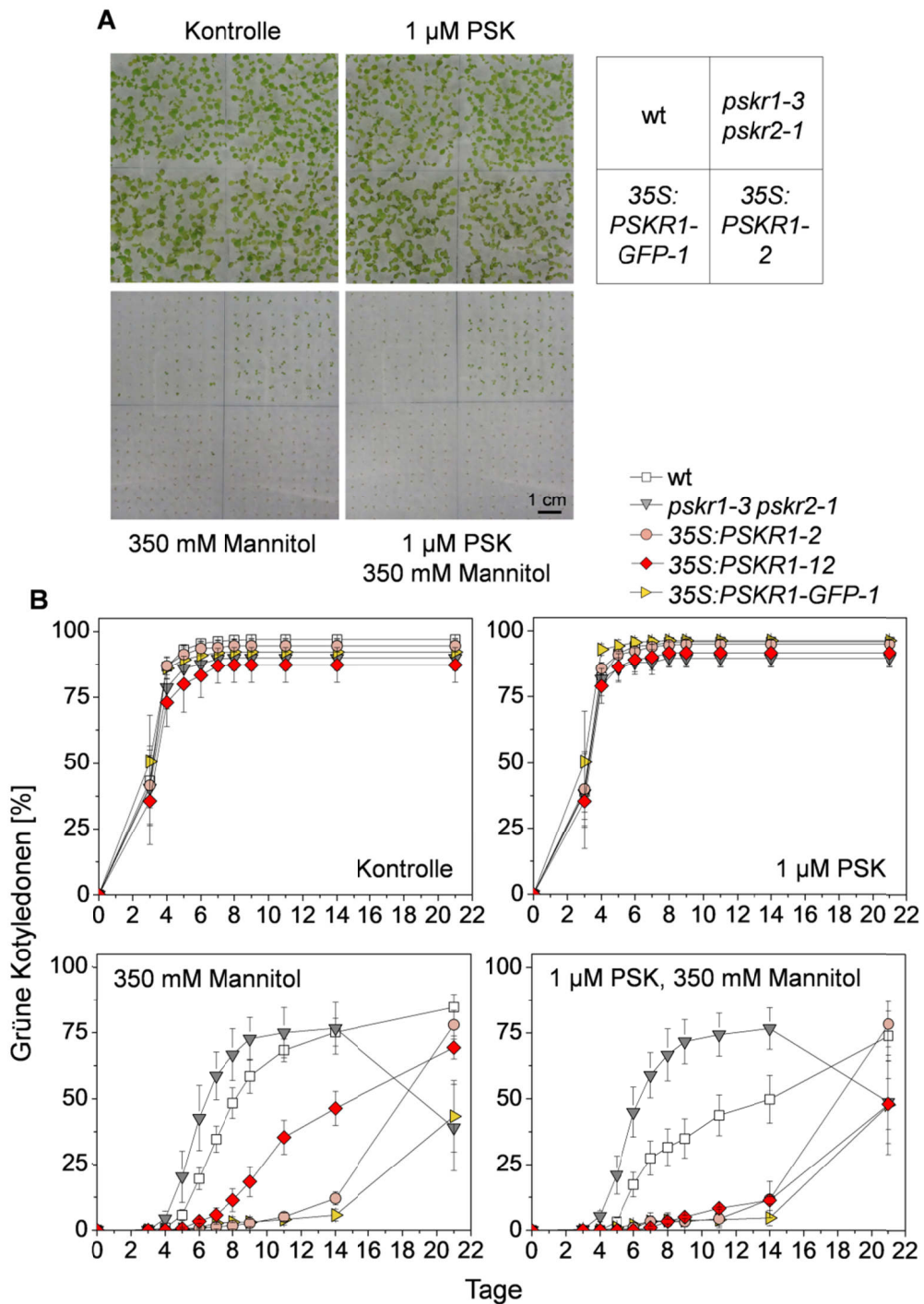


Abbildung 65: Abwesenheit der PSK-Rezeptoren bewirkt verfrühtes Ergrünen der Kotyledonen und Verwelken der Keimlinge bei osmotischem Stress.

Analyse des Ergürens der Kotyledonen in Antwort auf Mannitol und PSK. Werte sind Mittelwerte (\pm SE), $n = 3$, 3 unabhängige Experimente, die jeweils das Ergüren von 100 Keimlingen auswerten. Keimlinge mit grünen ausgebreiteten Kotyledonen wurden gezählt.

A Phänotyp sieben Tage nach Stratifizierung.

B Entwicklung grüner Kotyledonen in Anwesenheit von Mannitol und PSK über 21 Tage nach Stratifizierung.

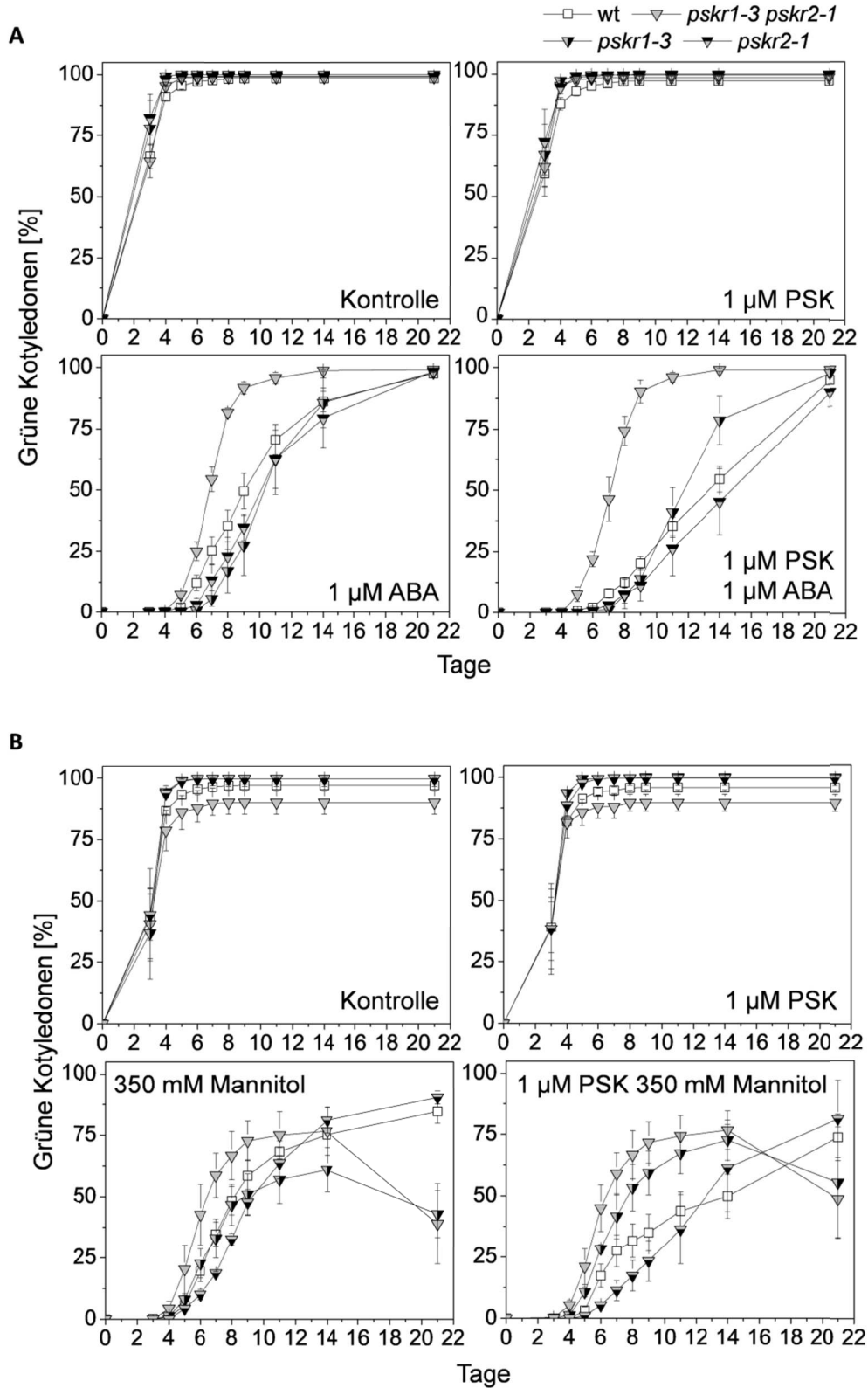


Abbildung 66: Das Ergrünen der Kotyledonen unter osmotischem Stress wird durch PSKR1 und PSKR2 gemeinsam reguliert.

Analyse des Ergrünes der Kotyledonen in Antwort auf ABA-, Mannitol- und PSK-Behandlung. Werte sind Mittelwerte (\pm SE), $n = 3$, drei unabhängige Experimente, bei denen jeweils 100 Samen ausgewertet wurden.

A Saatgut behandelt mit oder ohne 1 μ M ABA und/oder 1 μ M PSK.

B Saatgut behandelt mit oder ohne 350 mM Mannitol und/oder 1 μ M PSK.

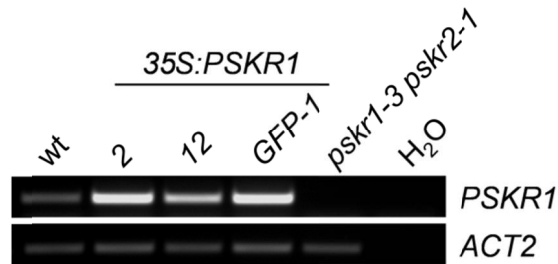


Abbildung 67: Expressionsanalyse *PSKR1*-überexprimierender Linien.

Die Überexpression von *PSKR1* wurde für die Linien *35S:PSKR1-2* und *35S:PSKR1-12* (Hartmann *et al.*, 2013) sowie *35S:PSKR1-GFP-1* (Ladwig *et al.*, 2015) bestätigt. Als pflanzliches Material diente der Spross 14 Tage alter Keimlinge.

zu Kapitel 3.1.7

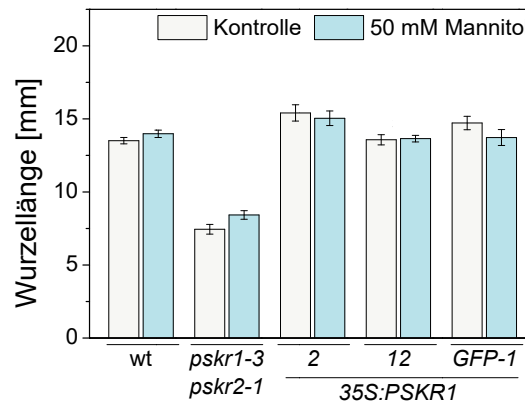


Abbildung 68: Mäßiger osmotischer Stress hat keine Auswirkungen auf das Primärwurzelwachstum.

Vier Tage alte Keimlinge wurden auf Medium transferiert, das mit oder ohne 50 mM Mannitol versetzt worden war und nach weiteren sieben Tagen Anzucht analysiert. Es wurde die Primärwurzellänge (\pm SE) im Wildtyp, *pskr1-3 pskr2-1* und den Überexpressionenlinien *35S:PSKR1-2*, *35S:PSKR1-12* und *35S:PSKR1-GFP-1* analysiert. (ein Experiment, n = 8).

zu Kapitel 3.2

Hintergrundinformationen zu PSK-regulierten Transkriptionsfaktoren und entwicklungsspezifischen Genen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Literurrecherche zu den durch PSK regulierten TFs und entwicklungsspezifischen Genen aufgeführt. Sie sind in Verbindung mit der jeweiligen Proteinfamilie, der sie zugehörig sind, beschrieben.

MADS-Box Transkriptionsfaktoren	Seite 188
Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren	Seite 190
Transkriptionsfaktoren mit ZF-Motiv	Seite 192
NAC-Domänentranskriptionsfaktoren	Seite 195
AP2/EREBP-Transkriptionsfaktoren	Seite 197
MYB-Domänentranskriptionsfaktoren	Seite 200
bHLH-Proteine	Seite 201
OSR-Proteinfamilie	Seite 203

MADS-Box Transkriptionsfaktoren

Die Familie der MADS-Box TFs umfasst etwa 100 Mitglieder in *Arabidopsis* (Qu & Zhu, 2006), die vor allem für ihre Funktion als Blütenmeristemidentitätsgene bekannt sind (Yanofsky *et al.*, 1990; Jack *et al.*, 1992; Goto & Meyerowitz, 1994). MADS-Box TFs können als Homo- oder Heterodimere an die DNA binden und dadurch die Expression von Genen beeinflussen (Davies *et al.*, 1996; Riechmann *et al.*, 1996). Die Familie lässt sich in fünf Untergruppen unterteilen, M α , M β , M γ , M $\gamma\delta$ und MIKC (Pařenicová *et al.*, 2003). Zu der MIKC-Untergruppe gehören zwei der drei durch PSK-hochregulierten TFs, *AGL17* (*AGAMOUS-like 17*) und *AGL21* (*AGAMOUS-like 21*) (Abbildung 27). Die beiden TFs sind auf Sequenzebene nah miteinander verwandt und teilen eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der Genprodukte von 73,4% (Burgeff *et al.*, 2002; De Folter *et al.*, 2005). Da zudem beide Gene speziell in der Wurzel stark exprimiert sind (Czechowski *et al.*, 2004), liegt die Annahme nahe, dass sie redundant agieren. Jedoch zeigten Expressionsdaten, dass *AGL17* und *AGL21* unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen (Burgeff *et al.*, 2002). Vielmehr konnten ähnliche Expressionen bei *AGL17* und *AGL16* (*AGAMOUS-like 16*) sowie *AGL21* und *ANR1* (*ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1*) nachgewiesen werden, die ebenfalls nah verwandt sind. Daher gelten diese als möglicherweise redundant oder als Interaktionspartner (Burgeff *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2005). Diese vier Gene bilden eine Subgruppe der MIKC-Unterfamilie der MADS-Box-TFs, die ANR- oder AGL17-Familie (Burgeff *et al.*, 2002; Alvarez-Buylla *et al.*, 2010). Durch ihre auffallend starke Expression im Bereich der Wurzelspitze und der Tatsache, dass MADS-Box-Gene zumeist in Entwicklungsprozesse involviert sind, schienen *AGL17* und *AGL21* vielversprechende Kandidaten bezüglich einer möglichen Rolle in der PSK-

vermittelten Wurzelelongation zu sein. *AGL16* und *ANR1* wurden im Microarray nicht als reguliert identifiziert.

AGAMOUS-LIKE 17 (AGL17)

AGL17 ist in der lateralen Wurzelhaube und in der Rhizodermis oberhalb der lateralen Wurzelhaube bis hin zur Elongationszone, sowie mit hoher Wahrscheinlichkeit im Perizykel und anderen Zentralzylinderzellen exprimiert (Burgeff *et al.*, 2002). Eine Regulation der Wurzelentwicklung durch *AGL17* ist bisher nicht beschrieben. Bekannt jedoch ist, dass *AGL17* während des Übergangs in die Blühphase im Spross zunehmend exprimiert wird und diesen Übergang durch eine Regulation der Blütenmeristemidentitätsgene *LFY* (*LEAFY*) und *AP1* (*APETALA 1*) vorantreibt (Han *et al.*, 2008).

AGAMOUS-LIKE 21 (AGL21)

AGL21 dient in verschiedenen Entwicklungsabschnitten und Geweben als Umweltsensor, indem es durch Hormone und Umweltstressoren aktiviert wird (Yu *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2017). Es ist vor allem in der Wurzel exprimiert, aber auch in Schoten, Blüten, getrockneten Samen und in sich entwickelnden Embryonen (Burgeff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2014). Eine sehr starke Expression ist in der Wurzelspitze im Bereich des ruhenden Zentrums zu beobachten (Burgeff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2014). Eine Regulation der Elongation der Primärwurzel durch *AGL21* wurde nicht beobachtet (Yu *et al.*, 2014). Es gibt jedoch Hinweise, dass *AGL21* mit *SIEL* (*SHORT-ROOT INTERACTING EMBRYONIC LETHAL*), einem TF-Transportprotein interagiert (Koizumi *et al.*, 2011). Ein *knockout* dieses Gens wiederum führt zu einer stark verkürzten Wurzel und einer veränderten Kortexschicht (Koizumi *et al.*, 2011), vergleichbar mit dem Phänotyp der *tpst-1*-Mutante (M. Sauter, Daten unveröffentlicht). Zudem ist eine Expression im Bereich der Lateralwurzelsprimordien bekannt (Burgeff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2014). In der Lateralwurzelentwicklung agiert *AGL21* als positiver Regulator bezüglich der Bildung und Elongation (Yu *et al.*, 2014). Durch den TF wird die lokale Auxinbiosynthese verstärkt und eine Auxinakkumulation in den Lateralwurzeln hervorgerufen (Yu *et al.*, 2014). Zudem fördert *AGL21* die Zellteilung der Lateralwurzelsprimordien durch eine Induktion der Expression des Zellzyklusgens *CYCB1;1* (*CYCLIN B1;1*) (Yu *et al.*, 2014). Weiterhin ist *AGL21* in die Kontrolle der Samenkeimung involviert durch eine direkte Bindung an und dadurch positive Regulation des TFs *ABI5* (*ABA INSENSITIVE 5*) (Yu *et al.*, 2017). Dadurch werden die Samenkeimung und die Keimlingsentwicklung nach der Keimung inhibiert. Sowohl in den Lateralwurzeln als auch in keimenden Samen wird die *AGL21*-Expression durch ABA, Auxin, NaCl, Methyljasmonat, Stickstoffmangel, Trockenstress und osmotischen Stress induziert (Gan *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2017). Zudem sind im Promotor des Gens einige Bindungsstellen für hormonabhängige Faktoren vorhanden (Yu *et al.*, 2014). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei *AGL21* um einen nicht-zellautonomen TF handelt (Koizumi *et al.*, 2011).

Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der HD-TFs ist vor allem bekannt aus dem tierischen Modellorganismus *Drosophila melanogaster*. In diesem sind die der Familie zugehörigen homöotischen/musterbildenden Gene in die Regulation der Segmentierung und des Körperplans der Fliege involviert (McGinnis *et al.*, 1984; Gehring, 1987). Sie sind charakterisiert durch die Anwesenheit einer sogenannten Homöobox, einem DNA-bindenden Bereich, der als Homöodomäne bekannt ist (Scott & Carroll, 1987; Laughon, 1991). In *Arabidopsis* sind Gene dieser Gruppe vor allem für ihre Regulation der Meristemidentität und -entwicklung bekannt. Die Familie umfasst eine Anzahl von etwa 90 Genen (Riechmann, 2006), die oftmals zusätzliche Domänen aufweisen, die die DNA-Bindeaktivität beeinflussen. Aufgrund der HD-Domäne und der zusätzlichen Domänen wird die Familie in sechs Untergruppen unterteilt: HD-ZIP (HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER), PHD (PLANT HOMEODOMAIN), BELL (BEL1-like), ZF-HD (ZINC-FINGER HOMEODOMAIN), WOX (WUSCHEL-related HOMEODOMAIN), und KNOX (KNOTTED1-like HOMEODOMAIN) (Chan *et al.*, 1998; Riechmann *et al.*, 2000). Zu den wohl bekanntesten Mitgliedern der Gruppe gehören *WUS* (*WUSCHEL*), das im Spross exprimiert wird und dort das Stammzellschicksal reguliert (Mayer *et al.*, 1998; Bäurle & Laux, 2005), sowie *WOX5* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5*), das das Pendant zu *WUSCHEL* im Wurzelapikalmeristem verkörpert (Nardmann *et al.*, 2009; Stahl *et al.*, 2009). Die HD-Familie beinhaltet zwei durch PSK herunterregulierte Gene, *PDF2* (*PROTODERMAL FACTOR 2*) und *HB24* (*HOMEODOMAIN PROTEIN 24*), die zu unterschiedlichen Untergruppen der HD-Klasse gehören (Abbildung 31).

PROTODERMAL FACTOR 2 (PDF2)

PDF2 lässt sich in eine Untergruppe der HD-Familie einordnen, die etwa die Hälfte der HD-TFs in *Arabidopsis* umfasst. In der pflanzenspezifischen HD-ZIP-Familie folgt direkt auf die HD-Domäne ein Leucinzippermotiv (*zipper* = Reißverschluss) (Ruberti *et al.*, 1991; Riechmann *et al.*, 2000). Dieses Doppelmotiv ist für eine Dimerisierung der Faktoren verantwortlich, die essentiell für die DNA-Bindung zu sein scheint (Ruberti *et al.*, 1991; Sessa *et al.*, 1997). Diese HD-ZIP-Gruppe lässt sich wiederum in vier Untergruppen unterteilen (HD-ZIP I - IV) (Sessa *et al.*, 1998). Die HD-ZIP Unterfamilie IV, auch HD-GL2 Gruppe genannt, aufgrund des zuerst identifizierten Gens *GLABRA2*, enthält 16 Mitglieder (Abe *et al.*, 2003b; Schrick *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006), zu denen *PDF2* gehört. Es ist ein in der L1-Schicht, also im Protoderm des Sprossapikalmeristems, und in der Epidermis von Sprossorganen spezifisch exprimiertes Gen, das in einer nicht-zellautonomen Weise zusammen mit seinem Homolog *AtML1* (*Arabidopsis thaliana* *MERISTEM LAYER 1*) die Epidermisidentität spezifiziert (Abe *et al.*, 2003b; Kamata *et al.*, 2013). Eine Einzelmutation der Gene zeigt keinen abnormen Phänotyp. Bei einer T-DNA-Insertion in beiden Genen ist die Bildung der Epidermis und dadurch die gesamte (Spross-)Entwicklung von der Embryogenese an verändert. Je nach Stärke der Auswirkung der T-DNA-Insertionen kann die

Doppelmutation unterschiedlich starke Phänotypen hervorrufen (Abe *et al.*, 2003b; Kamata *et al.*, 2013; San-Bento *et al.*, 2013; Ogawa *et al.*, 2015). Die beiden Gene scheinen redundante Rollen zu übernehmen (San-Bento *et al.*, 2013; Ogawa *et al.*, 2015). Eine Doppelmutation der Gene kann bis hin zum Arretieren der Embryoentwicklung im globulären Stadium führen (San-Bento *et al.*, 2013; Ogawa *et al.*, 2015). PDF2 bindet an den Promotor von *ACR4*, einer Rezeptorkinase, die in die Epidermisentwicklung involviert ist (Tanaka *et al.*, 2002). PDF2 und AtML1 homo- und heterodimerisiert mit AtML1 (Abe *et al.*, 2003b; San-Bento *et al.*, 2013). Es scheint ein *Feedbackloop* von PDF2, AtML1 und ACR4 (Abe *et al.*, 2003b) zu existieren. ACR4 induziert *PDF2* und *AtML1*, die wiederum ihre eigene Expression und die von *ACR4* reprimieren (San-Bento *et al.*, 2013). Bezüglich der Samenkeimung ist eine Interaktion von AtML1 und PDF2 mit DELLA-Proteinen bekannt (Rombolá-Caldentey *et al.*, 2014). Durch GA (Gibberellin) werden die DELLA-Proteine bei der Keimung degradiert, die beiden TFs freigesetzt und können GA-responsive Gene aktivieren und somit die Keimung vorantreiben (Rombolá-Caldentey *et al.*, 2014). In der späteren Entwicklung der Sprossorgane sind weiterhin die Erhaltung der Epidermisintegrität und die Epidermiszellendifferenzierung (Ogawa *et al.*, 2015) von großer Bedeutung. Eine Überexpression von *PDF2* führt zu einem verspäteten Eintritt in die generative Phase/einer verspäteten Blüte (Abe *et al.*, 2003b). Nach dem Eintritt in die generative Phase führt eine Repression von *PDF2* zu einer veränderten Blütenmorphologie (Abe *et al.*, 2003b), die durch einen Mehrfach-*knockout* mit anderen Mitgliedern der der HD-ZIP IV-Gruppe verstärkt wird (Kamata *et al.*, 2013). Bei einem Doppel-*knockout* von *AtML1* und *PDF2* geht das Septum der Schote verloren (Ogawa *et al.*, 2015).

HOMEODOMAIN PROTEIN 24 (HB24)

Das zweite durch PSK reprimierte Mitglied der HD-Familie verfügt ebenfalls zusätzlich zur HD- über eine weitere funktionelle Domäne. Bei HB24 handelt es sich um ein Zinkfinger-Homöodomänenprotein, was den alternativen Namen des Gens *ZHD6* (*ZINC FINGER HOMEODOMAIN 6*) erklärt. Das Zinkfingermotiv dieser 14 Mitglieder umfassenden Untergruppe ist stromaufwärts der HD-Domäne lokalisiert und diese wiederum unterscheidet sich strukturell leicht von der anderer Mitglieder der HD-Familie (Tan & Irish, 2006; Hong *et al.*, 2011). Proteine dieser Unterfamilie können homo- und heterodimerisieren (Tan & Irish, 2006). Die HD-Domäne ist essentiell für die DNA-Bindung und die Gene verfügen über keine eigene Aktivierungsdomäne, was eine Interaktion mit anderen TFs impliziert (Tan & Irish, 2006). Die ZF-HD-Gene sind vorwiegend in Blütengewebe exprimiert (Tan & Irish, 2006). Das PSK-herunterregulierte *HB24* scheint jedoch im gesamten Kormus gleichmäßig exprimiert zu sein und eine mögliche Interaktion mit mehreren Mitgliedern derselben Gruppe einzugehen (Tan & Irish, 2006). Laut eFP Browser (Winter *et al.*, 2007) ist die Expression im Spross am stärksten, insbesondere im Bereich des Sprossapikalmeristems, in den Stomata, den Petioli, den Blättern und den Antheren. Auch in Embryonen soll das Gen exprimiert sein. Eine Interaktion mit und

dadurch Unterbindung der Aktion von MIF1 (MINI ZINC FINGER 1) scheint ebenfalls möglich (Hong *et al.*, 2011). Bei MIF1 handelt es sich um ein in die Hormonantwort involviertes Protein, das in multiplen Entwicklungsprozessen wirkt (Hu & Ma, 2006 ; Hu *et al.*, 2011).

Transkriptionsfaktoren mit ZF-Motiv

Eine weitere Großgruppe von TFs, die jedoch nicht als eine zusammengehörige Familie angesehen wird, verfügt über Zinkfinger motive (ZF). Hierbei handelt es sich um Aminosäuresequenzen, die eine Zinkatom-bindende Aktivität aufweisen können, die eine Interaktion mit DNA, RNA und Proteinen ermöglichen können. Je nach Anzahl und Position der Zinkatom-bindenden Aminosäuren Cystidin (C) und Histidin (H), werden die putativen TFs in verschiedene Untergruppen unterteilt.

DNA-BINDING WITH ONE FINGER 1.2 (DOF1.2)

Das PSK-herunterregulierte Gen *DOF1.2* gehört zu der Familie der DOF-TFs (DNA-BINDING WITH ONE FINGER) und ist bisher nicht näher beschrieben. Die DOF-Proteine bilden ausschließlich über Cysteine einen einzelnen Zinkfinger und werden demnach als C2-C2-Zinkfingerproteine bezeichnet (Riechmann *et al.*, 2000; Umemura *et al.*, 2004). Die 37 Mitglieder der Familie (Yanagisawa, 2002) gelten als Transkriptionsregulatoren, könnten aber auch eine Rolle in der Protein-Protein-Interaktion spielen (Yanagisawa, 2004) und agieren in unterschiedlichen Mechanismen. Es gibt Hinweise darauf, dass sie in der Antwort auf abiotische Stressoren wirken (Zhang *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996), in Entwicklungsprozessen involviert sind (Papi *et al.*, 2000; Gualberti *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2010; Rueda-Romero *et al.*, 2012; Le Hir & Bellini, 2013; Negi *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2016), die Lichtantwort regulieren (Park *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2005), im Metabolismus der Pflanze agieren können (Yanagisawa *et al.*, 2004) und in Regulationen im Zusammenhang mit Phytohormonen agieren (Kang *et al.*, 2003; Konishi *et al.*, 2015). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass DOF-Proteine in der Pflanze mobil sind (Le Hir & Bellini, 2013).

C2H2-Zinkfingerproteine

Die Familie der C2H2-Zinkfingerproteine ist mit über 176 Mitgliedern die größte der bekannten ZF-Familien. Zugehörige dieser Gruppe werden als „klassische“ ZF-TFs angesehen und verfügen meist über zwei Zinkfingerdomänen (Englbrecht *et al.*, 2004). Die Familie lässt sich in drei Untergruppen teilen (A, B, C), wobei die Subgruppe C, mit etwa 140 Mitgliedern, die größte verkörpert und sich wiederum in drei Gruppen unterteilen lässt (C1, C2, C3) (Englbrecht *et al.*, 2004). Zwei der PSK-regulierten TFs finden sich in Subgruppe C1, *STZ* und *GAZ*, sind aber wiederum von der Aminosäuresequenz kaum miteinander verwandt und lassen sich wiederum in zwei unterschiedliche Subgruppen eingliedern: C1-1 (*GAZ*) und C1-2

(STZ) (Englbrecht *et al.*, 2004). Diese Unterteilung erfolgt, da STZ über zwei Zinkfingerdomänen mit der charakteristischen Aminosäuresequenz QALGGH verfügt, GAZ jedoch nur über eine putative Zinkfingerdomäne ohne diese Sequenz (Englbrecht *et al.*, 2004).

SALT TOLERANCE ZINC FINGER/ZINK FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 10 (STZ/ZAT10)

STZ oder ZAT10, dessen Expression durch PSK reprimiert wird, stand bereits im Fokus vieler Analysen. Diese zeigten, dass es vor allem in multiple abiotische Stressantworten involviert ist und durch den Einfluss von Phytohormonen reguliert wird. Es handelt sich um einen Calcium-responsiven (Bai *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2018) Expressionsrepressor (Sakamoto *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2004), der sowohl im Spross, als auch in der Wurzel, jedoch nicht in Blüten exprimiert wird (Lippuner *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2004). STZ bindet an stressresponsive Gene (Sakamoto *et al.*, 2004) und wird wiederum durch andere TFs (Dubois *et al.*, 2013; Geilen *et al.*, 2017) und MAP-Kinasen (*mitogen activated protein*) reguliert (Nguyen *et al.*, 2012). Bei starker Überexpression des Gens kann es zu einer Reduktion des Wachstums der Rosettenblätter kommen, die sich durch eine geringere Zellgröße manifestiert (Sakamoto *et al.*, 2004; Rossel *et al.*, 2007; Munekage *et al.*, 2015). Bei ZAT10-reprimierenden Linien ist ebenfalls eine Wachstumsreduktion sichtbar (Sakamoto *et al.*, 2004; Rossel *et al.*, 2007). Der einzige weitere Hinweis auf ein Aktion von STZ in der pflanzlichen Entwicklung ist eine mögliche Regulation der Induktion der Bildung von zylindrischen Zellen des Palisadenparenchyms von Blättern (Munekage *et al.*, 2015). Alle weiteren Erkenntnisse beschränken sich auf Stressantworten. Sowohl bei einer Überexpression als auch bei einer Repression von STZ ist eine verstärkte Toleranz gegenüber osmotischem und Salzstress zu beobachten (Lippuner *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2004; Mittler *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2012). STZ scheint eine Toleranz gegen Trockenstress (Sakamoto *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2004) und Hitzestress (Mittler *et al.*, 2006) zu bewirken und ist in die Antwort auf Kältestress (Sakamoto *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2012) involviert. STZ vermittelt eine Toleranz gegenüber oxidativem Stress, hervorgerufen durch zum Beispiel Salzstress oder Starklicht (Davletova *et al.*, 2005a; Davletova *et al.*, 2005b; Gadjev *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2013), indem es die Stressantwort durch die Aktivierung von ROS-abwehrenden (*reactive oxygen species*) Genen unterdrückt (Iida *et al.*, 2000; Mittler *et al.*, 2004; Mittler *et al.*, 2006; Rossel *et al.*, 2007; Pauwels *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). Es besteht eine Einbindung von STZ in den Signalweg und die Synthese der Hormone ABA (Sakamoto *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014), Gibberellin (Sakamoto *et al.*, 2004; Dubois *et al.*, 2013), Ethylen (Sakamoto *et al.*, 2004), Jasmonsäure (Sakamoto *et al.*, 2004; Libault *et al.*, 2007; Pauwels *et al.*, 2008), Auxin und Salicylsäure (Sakamoto *et al.*, 2004), was zusammen mit einer Regulation bei Behandlung von unter

anderem Chitooctase (Ramonell *et al.*, 2005; Libault *et al.*, 2007) einen Hinweis auf eine Rolle in der Pathogen- und Fraßfeindabwehr geben könnte (Taki *et al.*, 2005). Tatsächlich ist für die Kälteantwort und bei einer Reaktion auf Starklicht (Rossel *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Munekage *et al.*, 2015; van Buer *et al.*, 2016) eine systemische Antwort beschrieben, jedoch nicht bei Verwundung.

GA- AND ABA-RESPONSIVE ZINC FINGER (GAZ)

GAZ ist das zweite durch PSK in der Expression herunterregulierte Gen der C2H2-Zinkfingerfamilie. Es scheint die ABA- und GA-Homöostase transkriptionell zu regulieren und dadurch das Zusammenspiel der beiden Hormone während der Bildung des mittleren Kortex der Primärwurzel zu lenken (Lee *et al.*, 2016). Es handelt sich um einen möglichen Transkriptionsaktivator, der unter Umständen zellautonom agieren könnte (Lee *et al.*, 2016).

WRKY DNA-BINDING PROTEIN 48 (WRKY48)

Die Gruppe der WRKY-TFs umfasst in Arabidopsis etwa 74 Mitglieder (Eulgem & Somssich, 2007). Diese pflanzenspezifischen Proteine sind dadurch charakterisiert, dass sie über mindestens eine Aminosäuresequenz, die das Motiv WRKYGQK enthält, die der Namensgeber der Gruppe ist, und mindestens ein Zinkfingermotiv verfügen (Rushton *et al.*, 1996). Aufgrund der Anzahl der WRKY-Domänen und der Sequenz der Zinkfingerdomäne(n) werden die Faktoren in drei Gruppen unterteilt, Gruppe I-III (Bakshi & Oelmüller, 2014). Mitglieder der WRKY-TF-Gruppen weisen eine hohe Varianz in der Gesamtstruktur der Proteine auf (Eulgem *et al.*, 2000) und gelten als positive oder negative Transkriptionsregulatoren, die sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden (Bakshi & Oelmüller, 2014). Die WRKY-TFs scheinen in einem komplexen Regulationsnetzwerk zu agieren, was ihre Erforschung erschwert (Ülker & Somssich, 2002).

Für die Mitglieder der Gruppe sind viele unterschiedliche Funktionen beschrieben, wobei eine Vielzahl der TFs die pflanzliche Antwort auf biotischen Stress reguliert (Eulgem & Somssich, 2007; Xing *et al.*, 2008; Pandey & Somssich, 2009; Bakshi & Oelmüller, 2014). Auch in der Blattseneszenz (Robatzek & Somssich, 2002; Guo *et al.*, 2004; Zentgraf *et al.*, 2010) und anderen Entwicklungsprozessen (Johnson *et al.*, 2002) wirken WRKY-TFs als Regulatoren. Zusätzlich sind WRKY-abhängige Reaktionen auf abiotische Stimuli wie Trockenheit und Salzstress, Hitze und Kälte beschrieben (Jiang & Deyholos, 2009; Li *et al.*, 2010a; Ren *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2010; Bakshi & Oelmüller, 2014). Diese Prozesse sind meist nah verknüpft mit der Regulation von Hormonsignalwegen. Es sind Beispiele für WRKY-Proteine bekannt, die stromauf- und abwärts von Phytohormonen wie ABA, Salicylsäure, Jasmonsäure, Ethylen, Auxin, Cytokinin und Brassinosteroiden wirken (Rushton *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1999; Journot-Catalino *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2010; Bakshi &

Oelmüller, 2014; Chen *et al.*, 2017). Sie können durch calciumabhängige Proteinkinasen phosphoryliert und epigenetisch kontrolliert werden (Park *et al.*, 2005; Gao & He, 2013).

Das durch PSK herunterregulierte *WRKY48* (*WRKY DNA-BINDING PROTEIN 48*, At5g49520) gehört zu der mit 14 Mitgliedern kleinsten Untergruppe der WRKY-TFs (Gruppe III) (Bakshi & Oelmüller, 2014) und verfügt über eine WRKY-Domäne mit einem Zinkfingermotiv. Es handelt sich um einen Transkriptionsaktivator (Kim *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2008), der durch bakterielle Pathogene induziert wird (Qutob *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2008) und der die basale pflanzliche Abwehrantwort, in Form von salicylsäureregulierten Genen, reprimiert (Ma *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2008). Die Expression des Gens wird durch abiotische Faktoren wie Kälte, Hitze, Trocken- und oxidativen Stress (Vanderauwera *et al.*, 2005) sowie durch mechanischen und/oder osmotischen Stress, verursacht durch Infiltration, reguliert (Xing *et al.*, 2008). Außerdem ist das Genprodukt in die lichtabhängige Entwicklung der Pflanze involviert (Lee *et al.*, 2007b) und wirkt sich negativ auf das Rosettenwachstum aus (Xing *et al.*, 2008). *WRKY48* wird durch calciumabhängige Proteinkinasen reguliert (Gao *et al.*, 2013; Gao & He, 2013) und könnte möglicherweise für ein mobiles Transkript kodieren (Thieme *et al.*, 2015).

NAC-Domänentranskriptionsfaktoren

Die Familie der pflanzenspezifischen NAC-Domänen TFs (NO APICAL MERISTEM, ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR, CUP-SHAPED COTYLEDON, kurz: NAM ATAF CUC) umfasst etwa 109 Mitglieder, die sich in 10 Untergruppen (I-X) unterteilen lassen (Jensen *et al.*, 2010). Zu ihnen gehören drei durch PSK herunterregulierte Gene: *NAC015/BRN1*, *NAC031/CUC3* und *NAC068/NTM1*. *NAC015* und *NAC031* sind in Gruppe II in unterschiedlichen Untergruppen (II-1 und II-3), *NAC068* in eine andere Gruppe (VII-1) einzuordnen. Die NAC-TFs, von denen einige eine Transmembranregion aufweisen (Olsen *et al.*, 2005), zeigen meist eine Transkriptionsaktivatoraktivität (Olsen *et al.*, 2005). Über die NAC-Domäne bilden die Proteine Homo- und Heterodimere (Xie *et al.*, 2000; Ernst *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2004). Die TFs agieren in unterschiedlichen Signalwegen. Das erste NAC-Domänengen wurde in der Petunie identifiziert, die bei Verlust von NAM (NO APICAL MERISTEM) kein Sprossapikalmeristem aufwies (Souer *et al.*, 1996). Zunächst waren vor allem Beispiele bekannt, die die Entwicklung der Pflanze sowohl im Spross als auch in der Wurzel steuern (Aida *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2000; Hibara *et al.*, 2003; Vroemen *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 2005). Später wurden Signalwege identifiziert, die eine Funktion der NAC-Faktoren in der Reaktion auf biotischen (Ren *et al.*, 2000; Delessert *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2010; Nuruzzaman *et al.*, 2013) und abiotischem Stress aufzeigen (Fujita *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2010; Nuruzzaman *et al.*, 2013).

NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 15 (NAC015)

Das durch PSK herunterregulierte TF-Gen *NAC015* oder *BRN1* (*BEARSKIN 1*) ist nah verwandt mit zwei weiteren Genen der NAC II-1 Klasse, *BRN2/NAC070* (*BEARSKIN 2/NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 70*) und *SMB* (*SOMBRERO*). Zusammen mit diesen reguliert *NAC015* die Wurzelhaubendifferenzierung und -reifung (Bennett *et al.*, 2010). *NAC015* und *NAC070*, die positionsabhängig durch *SMB* aktiviert werden, werden in der äußersten Zellschichten der Wurzelhaube (Kamiya *et al.*, 2016), der Vaskulatur der Kotyledonen im Bereich der Hydathoden und in Lateralwurzeln exprimiert (Bennett *et al.*, 2010). Ein Ausschalten von *NAC015* allein erzeugt keinen beschriebenen Phänotyp. Kommt es zu einem Doppel-*knockout* von *NAC015* und *NAC070* führt dies dazu, dass sich die Zellschichten der Wurzelhaube während des Wachstums nicht voneinander lösen (Bennett *et al.*, 2010). Durch direktes Binden von *NAC015* (und *NAC070*) an den Promotor einer Polygalacturonase (*RCPG, ROOT CAP POLYGALACTURONASE*), wird die Zellseparierung der Wurzelhaubenzellen vorangetrieben (Kamiya *et al.*, 2016).

NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 31 (NAC031)

Das ebenfalls durch PSK reprimierte, hochkonservierte (Kwon *et al.*, 2006; Blein *et al.*, 2008) *NAC031* oder *CUC3* (*CUP SHAPED COTYLEDON 3*) ist nah verwandt mit zwei weiteren Genen seiner Untergruppe, *CUC1* (*CUP SHAPED COTYLEDON 1*) und *CUC2* (*CUP SHAPED COTYLEDON 2*) (Vroemen *et al.*, 2003). Mit partieller Redundanz regulieren diese TFs die Anlegung von zahlreichen Organgrenzen (Aida *et al.*, 1997; Takada *et al.*, 2001; Vroemen *et al.*, 2003). Ein prägnanter Phänotyp verschaffte der Genfamilie ihren Namen, da es bei einem Verlust der Gene dazu kommen kann, dass die Kotyledonen entlang ihrer Seiten becherförmig fusionieren (*cup* = Becher) (Vroemen *et al.*, 2003; Hibara *et al.*, 2006). *CUC3* ist in Bereichen exprimiert, die an (späteren) Organgrenzen lokalisiert sind (Vroemen *et al.*, 2003; Hibara *et al.*, 2006). Es ist von der Embryogenese an (Hibara *et al.*, 2006; Balkunde *et al.*, 2017) in die Formung von Organen involviert. Dies geschieht durch ein reduziertes Wachstum an Stellen, an denen Organseparierungen stattfinden sollen (Vroemen *et al.*, 2003). Nach der korrekten Ausformung der Kotyledonen ist es in die Separierung von Rosettenblättern und den Erhalt von Einbuchtungen am Blattrand involviert (Hibara *et al.*, 2006; Hasson *et al.*, 2011). Bei der Ausformung cauliner Blättern und der zugehörigen Petioli verhindert es ebenso die Organfusionen und hilft dadurch bei der Formung von blattachselständigen Primordien und dem Erhalt einer geregelten Phyllotaxis (Hibara *et al.*, 2006; Burian *et al.*, 2015). In der Blütenentwicklung ist es, angeregt durch Cytokinin, in die Formung von Blütenprimordien und in die spätere Trennung der Blütenorgane (Vroemen *et al.*, 2003; Hibara *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010b) sowie die Trennung der Ovuli involviert (Gonçalves *et al.*, 2015). Zusätzlich zu den Aktionen im Spross ist eine Expression des Gens rund um Lateralwurzeln beschrieben, was ein Hinweis auf eine Regulation der Ausbildung des Wurzelsystems sein könnte (Vroemen *et al.*, 2003). *CUC3* wird durch miRNAs und TFs

reguliert (Belles-Boix *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009a; Lie *et al.*, 2012; Espinosa-Ruiz *et al.*, 2017; Koyama *et al.*, 2017) und kann physikalisch mit anderen CUC-Faktoren interagieren (Gonçalves *et al.*, 2015).

NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 68 (NAC068)

Das dritte durch PSK hochregulierte Mitglied der NAC-TFs ist *NAC068* oder *NTM1* (*NAC WITH TRANSMEMBRANE MOTIF 1*). Es wird als eine dormante, membrangebundenen Form produziert und durch einen Stimulus, möglicherweise Kälte oder ABA, von der Membran proteolytisch gespalten (Kim *et al.*, 2006; Kim & Park, 2007). Die abgespaltene, aktivierte Form wird in den Nukleus transportiert und induziert dort als Transkriptionsaktivator die Expression von cyclinabhängigen Kinaseinhibitorgenen, die zu einer Reduktion der Zellteilungsaktivität beitragen (Kim *et al.*, 2006). Wird eine aktive Form des Proteins, ohne Membranbindedomäne, konstitutiv exprimiert, ist ein reduziertes Wachstum mit verkleinerten Pflanzenorganen, hervorgerufen durch eine reduzierte Zellanzahl mit einer erhöhten Zellgröße, die Folge. Bei einem *knockout* des Gens ist ein elongiertes Hypokotyl zu beobachten, bei dem sich die Zellanzahl jedoch nicht signifikant zum Wildtyp unterscheidet. Die primäre Rolle von NAC068 scheint spezifisch verbunden mit dem Cytokininsignalweg in der Zellzykluskontrolle, wobei Cytokinine zur Proteinstabilität sowohl der membrangebundenen als auch der gespaltenen Form beitragen (Kim *et al.*, 2006). Die Regulation der Aktivität findet auf Ebene des Spaltungsprozesses und der Proteinstabilität statt (Kim & Park, 2007).

AP2/EREBP-Transkriptionsfaktoren

Die AP2/EREBP-Familie ist eine übergeordnete Gruppe pflanzenspezifischer TFs und umfasst 147 Mitglieder in *Arabidopsis* (Nakano *et al.*, 2006a). Die AP2-Domäne wurde im *Arabidopsis*-Protein AP2 (*APETALA2*) entdeckt, das die Blütenentwicklung reguliert (Jofuku *et al.*, 1994). Ein ähnliches konserviertes Motiv wurde in vier DNA-bindenden Proteinen in Tabak (*Nicotiana tabacum* L.), EREBP1 - 4 (ETHYLENE-REPOSITIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 1 - 4), inzwischen ERF1 - 4 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 - 4), gefunden und ist in die ethylenresponsive Transkription von Genen involviert (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). Beide Domänen sind nah miteinander verwandt (Weigel, 1995). Der Name der Gruppe kann unter Umständen irreführend sein, da nicht alle Mitglieder eine Ethylenresponsivität aufweisen (Hess *et al.*, 2011).

Die ERF/AP2-Familie lässt sich in vier Untergruppen unterteilen: AP2, RAV (RELATED TO ABA INSENSITIVE 3/VIVIPAROUS 1), ERF und DREB (Sakuma *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder dieser Gruppen in die Regulierung unterschiedlicher Prozesse involviert sind wie zum Beispiel Wachstum und Entwicklung (van der Graaff *et al.*, 2000; Banno *et al.*, 2001), Stressantworten (Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998) und den Metabolismus (Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004).

Nach Nakano *et al.* (2006a) können die ERF und DREB-Unterfamilien mit ihren 122 Mitgliedern als ERF-Familie zusammengefasst werden und wiederum in Subgruppen (I-X) gegliedert werden. Für diese Familie, in die alle der drei PSK-reprimierten ERF-TFs eingeordnet werden können, ist insbesondere ihre Rolle in der abiotischen und biotischen Stressantwort bekannt (Agarwal *et al.*, 2006; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006; Mizoi *et al.*, 2012).

ERFVII-Transkriptionsfaktoren

Die Untergruppe ERFVII der ERF/AP2-TFs umfasst 5 Mitglieder: *RAP2.2 (RELATED TO AP2.2)*, *RAP2.3 (RELATED TO AP2.3)*, *RAP2.12*, *HRE1 (HYPOXIA RESPONSIVE ERF 1)* und *HRE2 (HYPOXIA RESPONSIVE ERF 2)*. Insbesondere die drei RAP2-Gene regulieren zusammen die pflanzliche Stressantwort bei geringer Sauerstoffverfügbarkeit, oxidativem und osmotischem Stress und vermitteln eine Toleranz gegenüber diesen (Papdi *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2017). Ihre Aktivität wird zu einem hohen Maße durch den *N-end rule*-Signalweg reguliert (Gibbs *et al.*, 2011; Gibbs *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2017), der besagt, dass bestimmte Aminosäuren des N-Terminus ubiquitinyliert und dadurch für einen Abbau im Proteasom markiert werden (Tasaki *et al.*, 2012). Die RAP2s werden konstitutiv exprimiert (Büttner & Singh, 1997; Papdi *et al.*, 2008; Mustrup *et al.*, 2009; Hinz *et al.*, 2010; Licausi *et al.*, 2010; Juntawong *et al.*, 2014; Gasch *et al.*, 2016), bei Stress stabilisiert und akkumulieren im Nukleus, wo sie die Aktivität anderer Gene regulieren können (Yao *et al.*, 2017).

RELATED TO AP2 3 (RAP2.3)

Der Transkriptionsaktivator *RAP2.3*, *ERF072 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 72)* oder *AtEBP (Arabidopsis thaliana ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN)* (Büttner & Singh, 1997), dessen Expression durch PSK herunterreguliert wird, reguliert die pflanzliche Antwort auf unterschiedliche Hormone. Seine Expression wird durch Ethylen induziert und es wirkt selbst wiederum im Ethylensignalweg (Büttner & Singh, 1997; Ogawa *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Deslauriers *et al.*, 2015). Auch ABA induziert die *RAP2.3*-Expression, welches wiederum eine erhöhte Sensitivität gegenüber ABA vermittelt, die sich negativ auf die Primärwurzelelongation auswirkt (Papdi *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2017). Es scheint auch über eine Interaktion mit einem DELLA-Protein, welches dessen Bindung an Ziel promotoren unterbindet, in den Gibberellin-Signalweg eingebunden zu sein und über diesen die Bildung des Apikalhakens zu beeinflussen (Marín-de la Rosa *et al.*, 2014). Zudem scheinen Cytokinin und Jasmonsäure die Expression von *RAP2.3* zu beeinflussen (Brenner *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). *RAP2.3* ist in multiple Stressantworten involviert. Es wirkt in der Stressantwort bei Eisenmangel, die mit einem Ethylensignal verbunden sein kann (Liu *et al.*, 2017) und in der Repression von stressinduziertem Zelltod (Ogawa *et al.*, 2005) und spielt eine untergeordnete Rolle als Aktivator von Hypoxie-responsiven Genen (Gasch *et al.*, 2016). *RAP2.3* vermittelt eine Verstärkung der Toleranz gegenüber oxidativem und osmotischem

Stress (Ogawa *et al.*, 2005; Papdi *et al.*, 2015), sowie gegenüber Hitze (Ogawa *et al.*, 2005), wird jedoch bei einer Kälteakklimation reprimiert (Blödner *et al.*, 2007). Weiterhin ist es in die pflanzliche Pathogenantwort involviert (Ogawa *et al.*, 2005; Govrin *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014). Ein Einfluss auf die Entwicklung der Pflanze unabhängig von Stressantworten ist für die Blütenentwicklung beschrieben (Ogawa *et al.*, 2007) zudem könnte es in die Regulation des Transports zweiwertiger Ionen involviert sein (Papdi *et al.*, 2015).

ETHYLENE AND SALT INDUCIBLE 3 (ESE3)

ESE3 ist eines der drei durch PSK herunterregulierten AP2/ERF-Gene, einzuordnen in die Gruppe der ERF-TFs der Untergruppe VIII (Nakano *et al.*, 2006a). Dieses Gen und sein Produkt sind bisher kaum beschrieben. Die Expression von *ESE3* wird, wie der Name sagt, durch Ethylen und Salz induziert (Nakano *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2011). Es gibt Hinweise darauf, dass es in die Antwort auf eine Vielzahl von Prozessen involviert ist. Seine Expression wird durch Trockenstress, Frost und Kälte reguliert (Lee *et al.*, 2005; Xin *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008) und könnte eine Rolle in der Lichtantwort und Photomorphogenese spielen (Hectors *et al.*, 2007; Kleine *et al.*, 2007). Es gibt Hinweise auf eine Einbindung in den Gibberellinsignalweg (Cao *et al.*, 2006), die ABA- und Methyljasmonatantwort, sowie die Ca²⁺-Signalübertragung (Sánchez *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2006b). Hinweise auf eine Rolle in der Sprossentwicklung gibt es ebenso (Cao *et al.*, 2006; Che *et al.*, 2006; Cai & Lashbrook, 2008).

ETHYLENE RESPONSE FACTOR 104 (ERF104)

ERF104 wird durch PSK in der Expression reprimiert und ist in die Untergruppe der ERF-TFs ERFIX eingeordnet (Nakano *et al.*, 2006a). Der TF verfügt über zwei putative Phosphorylierungsstellen und dient als Substrat für die MPK6 (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 6) (Nakano *et al.*, 2006a; Bethke *et al.*, 2009). Die Phosphorylierung des Proteins und die Stabilität der zugehörigen RNA beeinflussen die Aktivität von *ERF104* (Bethke *et al.*, 2009). Bei einer Flagellin-vermittelten Freisetzung von *ERF104* aus dem MPK6-*ERF104* Proteinkomplex, unterstützt durch sowohl den Ethylenbiosyntheseprozess als auch das Ethylensignal selbst, kann es an Zielgene binden und diese regulieren (Bethke *et al.*, 2009). Der ERF-TF dient als Transkriptionsaktivator und kann direkt an den Promotor von *PDF1.2 (PLANT DEFENSIN 1.2)*, einem Gen, involviert in die pflanzliche Pathogenabwehr (Manners *et al.*, 1998; Bethke *et al.*, 2009), binden. Dort scheint *ERF104* ein zentraler Regulator zu sein, da eine veränderte Expression des Gens zu einer Reduktion der Abwehr von Pathogenen führt. Zusätzlich reguliert es die schnelle Lichtantwort und retrograde Signalwege (Moore *et al.*, 2014; Vogel *et al.*, 2014) und wird ebenso durch Dunkelheit reguliert (Usadel *et al.*, 2008). Zudem gibt es Hinweise auf eine Einbindung in die Kohlenhydratbiosynthese durch chloroplastenlokalisierte Enzyme (Ferreira *et al.*, 2008) und

eine Einbindung in die Reaktion auf Veränderungen im Zuckerhaushalt der Pflanze (Osuna *et al.*, 2007). ERF104 könnte in Entwicklungsprozessen im Spross und in der Wurzel wirken (Ko *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006; Etchells *et al.*, 2012). Einen möglichen Zusammenhang mit der Stomabewegung (Cominelli *et al.*, 2005) sowie einen Hinweis auf eine Einbindung in den GA-Signalweg (Cao *et al.*, 2006) und die Flavonoid Biosynthese gibt es ebenso (Tohge *et al.*, 2005).

MYB-Domänentranskriptionsfaktoren

Die MYB-Domänen TFs umfassen etwa 339 Mitglieder in Arabidopsis (Feller *et al.*, 2011). TFs dieser Art sind in allen Eukaryoten zu finden (Ambawat *et al.*, 2013). Namensgeber für die Domäne war das zuerst identifizierte, onkogene v-MYB eines Myeloblastosevirus (Klempnauer *et al.*, 1982). Die Faktoren enthalten eine bis vier oder zusätzliche imperfekte MYB Motive (R), die entweder einzeln oder zusammen bei der DNA-Bindung oder Protein-Protein-Interaktion wirken (Feller *et al.*, 2011). Je nach Anzahl der Domänen werden die Faktoren in vier Klassen unterteilt (1R-, R2R3-, 3R- und 4R-MYB) (Stracke *et al.*, 2001; Dubos *et al.*, 2010). Die prominenteste Klasse in Pflanzen, die pflanzenspezifisch ist (Jiang *et al.*, 2004; Wilkins *et al.*, 2009), ist die R2R3-Gruppe mit etwa 125 Mitgliedern (Stracke *et al.*, 2001). Diese kann wiederum aufgrund ihrer C-terminalen Sequenz in 22 Untergruppen unterteilt werden (Kranz *et al.*, 2001; Stracke *et al.*, 2001; Dubos *et al.*, 2010). MYB-TFs wirken unter anderem in Entwicklungsprozessen (Mandaokar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009a; Ambawat *et al.*, 2013), Zellteilung und -differenzierung (Oppenheimer *et al.*, 1991; Noda *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2010a), in der biotischen und abiotischen Stressantwort (Ito *et al.*, 2001; Lippold *et al.*, 2009; Segarra *et al.*, 2009) und in der Antwort auf verschiedene Hormone (Urao *et al.*, 1993; Gubler *et al.*, 1995; Iturriaga *et al.*, 1996; Abe *et al.*, 2003a; Raffaele *et al.*, 2006; Ambawat *et al.*, 2013). Sie können als Transkriptionsaktivatoren und -repressoren wirken (Martin & Paz-Ares, 1997) und es gibt Hinweise darauf, dass ihre Aktivität durch microRNAs und epigenetische Faktoren reguliert wird (Reyes & Chua, 2007; Gehring *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011; Bai & Settles, 2015; Xu *et al.*, 2015; Roy, 2016). Sie scheinen nicht in essentielle Signalwege involviert zu sein (Meissner *et al.*, 1999), was jedoch möglicherweise auf eine Redundanz der Faktoren zurückzuführen ist.

MYB DOMAIN PROTEIN 88 (MYB88)

Das durch PSK hochregulierte Gen *MYB88* gehört zu der Gruppe der R3R3-MYB-Domänen-TFs (Stracke *et al.*, 2001). Zusammen mit dem überwiegend redundanten FLP (FOUR LIPS) bildet MYB88 eine eigene Subgruppe, die zu den basalen atypischen MYB-Proteinen gezählt wird (Dias *et al.*, 2003). Diese Kategorisierung erfolgt aufgrund von Aminosäuresubstitutionen in den MYB-DNA-Bindedomänen (Lai *et al.*, 2005). Es stand zur Diskussion ob die Faktoren aufgrund dieser Substitutionen direkt an die DNA binden und die

Transkription regulieren können. Dies konnte jedoch für einige Gene nachgewiesen werden (Xie *et al.*, 2010a; Xie *et al.*, 2010b; Chen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015a). Namensgebend für FLP ist seine Rolle in der Bildung von Stomata. Die zwei Schließzellen eines Stomas werden durch eine einzige asymmetrische Teilung direkt vor der terminalen Differenzierung produziert. Bei einem *knockout* von FLP werden mindestens vier Schließzellen gebildet (*four lips* = vier Lippen), die in direktem Kontakt zueinander stehen (Lai *et al.*, 2005). Normalerweise befindet sich mindestens eine nichtstomatäre Zelle zwischen zwei Stomata (Geisler *et al.*, 2000). Ein Doppel-*knockout* von *MYB88* und *FLP* verstärkt den Phänotyp (Lai *et al.*, 2005; Ohashi-Ito & Bergmann, 2006). Bei der Bildung von Stomata begrenzen FLP und *MYB88* den Eintritt der Zellen von der G1 in die S-Phase, und die Mitose selbst, was bei einem *knockout* eine erhöhte Endoreduplikation und die Bildung vermehrter Schließzellen zur Folge hat (Lee *et al.*, 2013). Dies geschieht durch eine Regulation von Zellzyklusgenen (Vanneste *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014). Außer in Stomata sind die Gene jedoch auch in weiteren Geweben exprimiert (Makkena *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2015). Sie sind in Entwicklungsprozesse wie die Bildung von Ovuli und die Megasporogenese eingebunden (Makkena *et al.*, 2012), was ebenfalls ein Hinweis auf ihre Aktivität im Zellzyklus ist. Zusätzlich scheint *MYB88* die Zellelongation zu unterstützen (Xu *et al.*, 2017). *MYB88* und FLP beeinflussen durch *PIN3*- und *PIN7*-Regulation (*PINFORMED 3/-7*) die auxinabhängige Entwicklung der Wurzel in Antwort auf die Gravitation (Chen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015a). Sie wirken in der abiotischen Stressantwort und unterstützen die Toleranz der Pflanze gegen Trocken- und Salzstress durch indirekte Induktion von Stressantwortgenen (*DREB2A*, *STZ*) (Xie *et al.*, 2010b) und gegen Frost- und Kältestress (Xie *et al.*, 2017). Zudem zeigt die Doppel-*knockout*-Linie von *MYB88* und FLP eine reduzierte Wahrnehmung in Bezug auf ABA (Xie *et al.*, 2010b).

bHLH-Proteine

Die Familie der bHLH-TFs ist in fast allen Organismen vertreten (Skinner *et al.*, 2010) und zeichnet sich strukturell durch die Anwesenheit eines Motivs aus, das N-terminal eine Sequenz mit basischen Resten für eine mögliche DNA-Interaktion aufweist und C-terminal eine HLH-Region, die als Dimerisierungsdomäne fungieren kann (Murre *et al.*, 1989; Ferre-D'Amare *et al.*, 1994). Diese HLH-Region besteht überwiegend aus hydrophoben Resten, die zwei Helices formen, separiert durch eine Schleife variabler Sequenz und Länge (Nair & Burley, 2000). Eine Interaktion der HLH-Region zweier separater Proteine führt zu einer Formung von Homo- und/oder Heterodimeren, sodass die basische Region beider Partner jeweils an eine Hälfte der DNA Erkennungssequenz bindet (Ma *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1997). So kann die Transkriptionsaktivität bestimmter Gene aktiviert oder reprimiert (Wang & Chen, 2008; Nakata *et al.*, 2013; Nakata & Ohme-Takagi, 2013; Liu *et al.*, 2015b), aber auch die Bindung der Faktoren an die DNA unterbunden werden. Insbesondere eine Interaktion von bHLH-Proteinen mit R2R3-MYB-Proteinen ist für diesen Fall beschrieben (Abe *et al.*, 2003a; Lin & Aoyama, 2012; Wang *et al.*, 2015c).

In Arabidopsis existieren etwa 162 bHLH-Gene, die, unabhängig von der bHLH-Domäne, sehr diverse Aminosäuresequenzen aufweisen (Feller *et al.*, 2011). Obwohl diese Proteinfamilie noch nicht sehr gut untersucht ist, ist jedoch bereits bekannt, dass die Faktoren in unterschiedlichen Signalwegen der Entwicklung und des Wachstums, aber auch im Metabolismus der Pflanze wirken (Zhao *et al.*, 2012). Hierbei ist für einige Genprodukte zugleich eine Wirkung in Entwicklungs- und Biosyntheseprozessen beschrieben, was durch eine Interaktion mit unterschiedlichen anderen Proteinen zu erklären ist. Zum Beispiel regulieren GLABRA3 (GL3), ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) und TRANSPARENT TESTA 8 (TT8) nicht nur die Anthocyanbiosynthese, sondern auch die Trichom- und Wurzelhaarbildung, sowie die Musterbildung der Stomata des Hypokotyls (Payne *et al.*, 2000; Bernhardt *et al.*, 2003; Bernhardt *et al.*, 2005; Pillitteri & Torii, 2007). Es gibt Mitglieder der Familie, die in lichtabhängige Signalwege involviert sind (Halliday *et al.*, 1999; Soh *et al.*, 2000; Huq & Quail, 2002; Leivar *et al.*, 2012) oder den Blühzeitpunkt (Ito *et al.*, 2012) und die Samenkeimung beeinflussen (Oh *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2011). Eine Aktion in den Signalwegen der Hormone Jasmonsäure (Kazan & Manners, 2013), Brassinosteroiden (Wang *et al.*, 2009b; Zhang *et al.*, 2009a) und ABA (Kim & Kim, 2006; Li *et al.*, 2007; Kurbidaeva *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014) wurde bereits beschrieben.

basic HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 129 (bHLH129)

Der durch PSK herunterregulierte TF *bHLH129* ist bisher nur wenig untersucht. Beschrieben ist, dass es sich um einen Transkriptionsrepressor handelt, dessen Expression durch ABA herunterreguliert wird (Tian *et al.*, 2015). Bei einer Überexpression des Gens kommt es zu einer verstärkten Elongation der Primärwurzel, bei einer gleichzeitigen Reduktion der Sensitivität gegenüber ABA (Tian *et al.*, 2015). In der untersuchten T-DNA-Insertionslinie konnte keine Veränderung der Phänotyps bezüglich der Wurzellänge beobachtet werden (Tian *et al.*, 2015). Die Expression einiger ABA-Signalweggene (SNRKs *SNF1-RELATED PROTEIN KINASEs* und *ABA INSENSITIVE 1*) ist bei einer Überexpression von *bHLH129* verändert. Zusätzlich wird die Expression des Gens durch Cytokinin und 2,4-Epibrassinolid herunterreguliert (Lee *et al.*, 2007a; Tian *et al.*, 2015). Das Gen ist besonders stark in der Wurzel und den Kotyledonen exprimiert. Eine Promotoraktivität ist zunächst in jungen Blättern, jedoch nicht mehr in älteren Blättern zu erkennen (Tian *et al.*, 2015).

BANQUO 3 (BNQ3)

Das durch PSK in der Expression hochreguliert *BNQ3* (*BANQUO 3*, At3g47710), *PRE4* (*PACLOBUTRAZOL RESISTANCE 4*) oder *bHLH162* (*basic HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 161*) zählt in die Gruppe der bHLH-Proteine, verfügt jedoch über Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung der eigentlich basischen Region und wird deshalb zu den atypischen bHLH-Proteinen gezählt (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Zu dieser Gruppe zählen etwa 27 Mitglieder (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Durch die Veränderungen der Aminosäuresequenz

ist es unwahrscheinlich, dass Proteine dieser Art direkt an die DNA binden (Hyun & Lee, 2006), weshalb sie nicht direkt als TFs bezeichnet werden können. Stattdessen ist eine Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der bHLH-Gruppe möglich, wodurch deren Bindung an die DNA und die Regulation der Transkription unterbunden werden kann (Fairman *et al.*, 1993; Bailey *et al.*, 2003; Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Hyun & Lee, 2006; Li *et al.*, 2006).

Die HLH-Region von BNQ3 ist homolog zu der fünf weiterer Proteine, BNQ1, BNQ2, PRE3, PRE5 und PRE6 (Hyun & Lee, 2006; Li *et al.*, 2006), welche redundant zu agieren scheinen. Eine Überexpression der Gene gab Hinweise darauf, dass diese eine Rolle in der gibberellinabhängigen Entwicklung spielen. Sie führt bei allen Mitgliedern zu einer Resistenz bei der Keimung gegen Paclobutrazol, einem Inhibitor der Gibberellinbiosynthese (Hedden & Graebe, 1985), einer Elongation des Hypokotyls und einer verfrühte Blüte (Hyun & Lee, 2006; Lee *et al.*, 2006b; Mara *et al.*, 2010). Eine Regulation des Brassinosteroidsignalwegs durch Mitglieder der Gruppe scheint ebenfalls stattzufinden. Diese scheinen mit Brassinosteroidsignalweginhibitoren zu heterodimerisieren und so den Brassinosteroidsignalweg zu verstärken (Wang *et al.*, 2009). Die durch einen *knockout* des membranständigen Brassinosteroidrezeptors BRI1 verursachte Reduktion des Sprosswachstums konnte durch Überexpression von *BNQ3* und seiner homologen Gene reduziert werden (Wang *et al.*, 2009b). Ein *knockout* der homologen Gene ruft jedoch keine Veränderung des Sprosswachstums hervor (Wang *et al.*, 2009b).

Drei der homologen Gene (*BNQ1-3*) sind zusätzlich zur Determination des Blühzeitpunktes in die Blütenmorphogenese involviert. Durch Bindung des Heterodimers AP3/PI (APETALA 3/PISTILLATA), zwei HD-TFs, die in die Spezifizierung der Petalenidentität involviert sind (Krizek & Meyerowitz, 1996), werden die *BNQ*-Gene reprimiert (Mara *et al.*, 2010). Bei einem *knockout* von *BNQ3* ist zusätzlich zu einer verspäteten Blüte eine Reduktion der Blütengröße und eine Reduktion der Chlorophyllkonzentration in den Blüten, kaulinen Blättern, im Stamm und in den Schoten zu beobachten (Mara *et al.*, 2010). Bei einer Überexpression erscheint eine verfrühte Blüte (Mara *et al.*, 2010). Der Phänotyp der verminderten Chlorophyllinlagerung scheint *BNQ3*-spezifisch zu sein. Die Genprodukte der *BNQ*-Gene können mit einem Regulator der Photomorphogenese (HFR1, LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED LIGHT 1) dimerisieren und so seine Aktivität unterdrücken (Mara *et al.*, 2010).

OSR-Proteinfamilie

Zuletzt wurden zwei von vier Mitgliedern der OSR-Genfamilie untersucht. Alle Mitglieder dieser Gruppe sind pflanzenhormonresponsive Gene (Hu *et al.*, 2003; De Paepe *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2015), deren Überexpression zu vergrößerten (Spross-)Organen, hervorgerufen durch vermehrte Zellteilung und/oder Zellexpansion, führt (Hu *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009a; Feng *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2014; Rai *et al.*, 2015). Charakteristisch für die Mitglieder dieser Gruppe ist die sogenannte OSR-Domäne, die sich aus zwei Transmembrandomänen und einer konservierten

Aminosäuresequenz zwischen diesen zusammensetzt (Hu *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016). Die Domäne ist essentiell für die Förderung des OSR-familienvermittelten Organwachstums (Feng *et al.*, 2011). Die Genprodukte, mit einer Ausnahme, OSR2, das an der Plasmamembran lokalisiert ist, sind alle am ER lokalisiert (Feng *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2014; Rai *et al.*, 2015). Untersuchungen an Mehrfach-*knockout*-Linien zeigten, dass die Mitglieder differentiell, aber gemeinsam an der Regulation der Zellteilung und -expansion wirken und so die letztendliche Organgröße mitbestimmen (Qin *et al.*, 2014), wobei keine direkte Interaktion der Mitglieder stattfindet (Feng *et al.*, 2011). Mitglieder der Familie werden durch Auxin, jedoch stärker durch Ethylen induziert (Hu *et al.*, 2003; De Paepe *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006; Markakis *et al.*, 2012; Rai *et al.*, 2015). Diese Induktion erfolgt sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene (Rai *et al.*, 2015). Für die durch Auxin hervorgerufene Induktion scheint Ethylen der Schlüssel zu sein (Rai *et al.*, 2015), dessen Biosynthese durch Auxin stimuliert wird (Abel *et al.*, 1995; Arteca & Arteca, 2008).

Die Produkte der beiden PSK-induzierten Gene *ARGOS* und *ARL* interagieren mit RTE1 (REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1) (Shi *et al.*, 2016), einem ethylenrezeptorinteragierenden Protein, das die Aktivität von *ETR1* (ETHYLENE RESPONSE 1) reguliert (Resnick *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2010), welches ebenfalls am ER lokalisiert ist (Ju & Chang, 2012). Expressionsänderungen der beiden OSR-Gene können die Ethylensensibilität der Pflanze in einem negativen Antwortmechanismus regulieren (Rai *et al.*, 2015).

AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE (ARGOS)

Die Expression von *ARGOS* wird, zusätzlich zu Auxin und Ethylen, ebenfalls durch Cytokinin induziert (Brenner *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006). Eine Überexpression von *ARGOS* und einem weiteren Mitglied der Gruppe, *OSR1*, dass ein ähnliches Expressionsmuster aufweist (Feng *et al.*, 2011), bewirkt eine andauernde Expression des AP2-TFs *ANT1* (AROMATIC AND NEUTRAL TRANSPORTER 1). Das Genprodukt von *ANT1* kann unter anderem IAA (Indol-3-Essigsäure; Ethylenvorstufe) und 2,4D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure; synthetisches Auxin) transportieren. Zusätzlich bewirkt eine *ARGOS*-Überexpression verlängerte Expressionszeit von *CYCD3;1* (*CYCLIN D3;1*), einem cytokininresponsiven Zellzyklusgen (Hu *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2011) und eine damit einhergehende erhöhte Zellanzahl in den Blättern (Krizek, 1999; Mizukami & Fischer, 2000). Das in den Überexpressionslinien sichtbar verstärkte Wachstum der Blätter wird somit durch die Beeinflussung der Dauer der Zellproliferation hervorgerufen (Hu *et al.*, 2003). Ein weiterer Phänotyp ist eine verspätete Blüte und eine erhöhte Saatgutproduktion sowie leicht verlängerte Wurzeln (Hu *et al.*, 2003). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass *ARGOS* die Trocken- und Salzstressantwort regulieren könnte (He *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2015).

ARGOS-LIKE (ARL)

Die Expression von *ARL* wird, zusätzlich zu einer Induktion durch Auxin und Ethylen, schwach durch Cytokinin und stark durch Brassinosteroide induziert, sowie durch ABA und GA reprimiert (Hu *et al.*, 2006). Das Expressionsmuster von *ARL* und *ARGOS* stimmt nicht überein (Hu *et al.*, 2006) es gibt jedoch Hinweise, dass das *ARL*-Transkript mobil ist, sodass die Genprodukte an gleicher Stelle aktiv sein könnten (Thieme *et al.*, 2015). Eine Überexpression von *ARL* bewirkt eine Vergrößerung unterschiedlicher Organe, wie der Kotyledonen, Rosettenblätter und anderer lateraler Organe sowie verlängerte Wurzeln und Hypokotyle (Hu *et al.*, 2006). Ein gegenteiliger Phänotyp ist bei Untersuchungen an *ARL*-reprimierenden Pflanzen zu beobachten (Hu *et al.*, 2006). Die Größenzu- oder -abnahme der Organe lässt sich vor allem auf eine Veränderung der Zellgröße und weniger der Zellanzahl zurückführen (Hu *et al.*, 2006). Der Einfluss auf die Zellexpansion könnte in Zusammenhang mit dem Brassinosteroidsignalweg stehen, da dieser die Zellexpansion und -elongation der Pflanze reguliert (Li & Chory, 1997; Wang *et al.*, 2001; Bishop & Koncz, 2002). Ist der Brassinosteroidrezeptor BRI1 ausgeschaltet, wird auch *ARL* herunterreguliert (Hu *et al.*, 2006). Eine Überexpression von *ARL* im *BRI1-knockout*-Hintergrund kann das reduzierte Wachstum der Pflanze zu einem gewissen Teil revertieren (Hu *et al.*, 2006). *ARL* scheint stromabwärts von BRI1 zu agieren und unterstützt partiell die brassinosteroidvermittelten Zellexpansionssignale (Hu *et al.*, 2006). Eine Zellexpansion erfordert eine Modifikation der Zellwand, die in diesem Fall durch TCH4 (TOUCH 4), einem Mitglied der XTH-Familie (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE) realisiert werden könnte, das sowohl durch Brassinosteroide als auch durch *ARL* hochreguliert wird (Xu *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2006). Es gibt zusätzlich Hinweise, dass *ARL* in der Lichtantwort wirkt (Lee *et al.*, 2007b).

zu Kapitel 3.2.1

Tabelle 18: Transkriptionsfaktorgene, deren Expression durch sulfatierte Peptide induziert wird.

Ergebnisse eines Microarrays (M. Sauter, unveröffentlicht), in dem Wurzeln fünf Tage alter Wildtyp- und *tpst-1*-Keimlinge, mit oder ohne PSK-Behandlung, als Material dienten. Ein Ergebnis wurde als Induktion (blau) bei einem Wert ≥ 2 , und als Repression (orange) bei einem Wert $\leq 0,5$ gewertet. Asteriske weisen auf in dieser Arbeit untersuchte* TFs.

Transkriptionsfaktorfamilie	Genlokus	Genbezeichnung	Relative Expression		
			<i>tpst-1</i> /wt	<i>tpst-1</i> +PSK/wt	<i>tpst-1</i> +PSK/ <i>tpst-1</i>
MADS-Box	At2g22630	<i>AGL17*</i>	0,36	0,75	2,12
	At4g37940	<i>AGL21*</i>	0,28	0,71	2,57
bHLH	At2g28160	<i>bHLH029/FIT1/FRU</i>	0,49	0,34	0,7
	At4g05170	<i>bHLH114</i>	0,48	0,63	1,31
	At4g25400	<i>bHLH118</i>	0,44	0,50	1,14
	At4g33880	<i>bHLH085/RSL2</i>	0,49	0,76	1,56
	At5g51790	<i>bHLH120</i>	0,42	0,62	1,47
AP2/EREBP	At1g46768	<i>ERF006/RAP2.1</i>	0,45	0,53	1,18
	At2g44940	<i>ERF034</i>	0,42	0,71	1,69
	At4g16750	<i>ERF039</i>	0,46	0,58	1,27
	At5g05410	<i>ERF045/DREB2A/DREB2*</i>	0,45	0,41	0,91
MYB	At2g02820	<i>MYB88</i>	0,42	0,90	2,17
	At5g14750	<i>MYB66/WER1/WER</i>	0,40	0,72	1,78
	At5g40330	<i>MYB23/ATMYBRTF</i>	0,49	0,92	1,88
	At5g65230	<i>MYB53</i>	0,43	0,81	1,9
NAC	At2g24430	<i>NAC38</i>	0,43	0,60	1,39
	At3g12977	<i>NAC domain transcriptional regulator superfamily protein</i>	0,41	0,35	0,84
Zinkfinger	At1g29860	<i>WRKY71</i>	0,45	0,35	0,78
	At2g40750	<i>WRKY54</i>	0,48	0,56	1,17
	At3g56400	<i>WRKY70</i>	0,29	0,21	0,71
	At3g58710	<i>WRKY69</i>	0,49	0,71	1,45
andere	At1g13300	<i>HRS1</i>	0,45	0,46	1,02
	At2g22840	<i>GRF1</i>	0,50	0,60	1,21
	At3g27940	<i>LBD26</i>	0,24	0,20	0,83
	At5g22920	<i>CHYR1/RZPF34</i>	0,42	0,27	0,64
	At5g57180	<i>CIA2</i>	0,49	0,48	0,99

Tabelle 19: Transkriptionsfaktorgene, deren Expression durch sulfatierte Peptide reprimiert wird.

Ergebnisse eines Microarrays (M. Sauter, unveröffentlicht), in dem Wurzeln fünf Tage alter Wildtyp- und *tpst-1*-Keimlinge, mit oder ohne PSK-Behandlung, als Material dienten. Ein Ergebnis wurde als Induktion (blau) bei einem Wert ≥ 2 , und als Repression (orange) bei einem Wert $\leq 0,5$ gewertet. Asteriske weisen auf in dieser Arbeit untersuchte* oder nur klonierte* TFs. *HB24* gehört sowohl zu den Homöodomänen- als auch den ZF-TFs.

Transkriptionsfaktorfamilie	Genlokus	Genbezeichnung	Relative Expression		
			<i>tpst-1</i> /wt	<i>tpst-1</i> +PSK/wt	<i>tpst-1</i> +PSK/ <i>tpst-1</i>
AUX/IAA	At3g16500	<i>IAA26/PAP1</i>	2,11	1,42	0,67
	At4g14560	<i>IAA1/AXR5</i>	2,14	1,30	0,61
bHLH	At2g43140	<i>bHLH129*</i>	2,86	0,63	0,22
	At4g00050	<i>bHLH016/UNE10</i>	2,95	1,85	0,63
	At5g65320	<i>bHLH099</i>	2,23	1,18	0,53
AP2/EREBP	At1g12890	<i>ERF088</i>	2,90	1,51	0,52
	At1g21910	<i>ERF012/DREB26</i>	2,08	1,40	0,67
	At1g77640	<i>ERF013</i>	3,27	1,83	0,56
	At3g16770	<i>ERF072/EBP/RAP2.3*</i>	4,56	1,97	0,43
	At4g18450	<i>ERF091</i>	2,22	1,15	0,52
	At5g25190	<i>ERF003/ESE3</i>	3,05	1,45	0,48
	At5g61600	<i>ERF104</i>	1,09	0,49	0,45
HD	At2g18350	<i>HB24/ZHD6*</i>	2,04	0,91	0,45
	At4g04890	<i>PDF2*</i>	4,25	1,53	0,36
NAC	At1g33280	<i>NAC015/BRN1*</i>	3,10	1,38	0,44
	At1g76420	<i>NAC031/CUC3*</i>	2,77	1,28	0,46
	At4g01540	<i>NAC068/NTM1/NTL12*</i>	2,11	0,80	0,38
Zinkfinger	At1g21340	<i>DOF1.2*</i>	3,08	1,38	0,45
	At1g27730	<i>STZ/ZAT10*</i>	3,27	0,87	0,27
	At2g18490	<i>GAZ*</i>	1,68	0,78	0,46
	At2g37740	<i>ZFP10</i>	2,28	1,51	0,66
	At2g47260	<i>WRKY23</i>	2,21	1,90	0,86
	At5g49520	<i>WRKY48*</i>	3,10	1,24	0,40
andere	At1g75390	<i>bZIP44</i>	2,61	2,01	0,77
	At3g06020	<i>FAF4</i>	7,06	8,35	1,18
	At3g61310	<i>AHL11</i>	2,25	1,63	0,73
	At5g06080	<i>LBD33</i>	3,05	2,49	0,81
	At5g19650	<i>OFP8</i>	2,96	2,05	0,69
	At5g65330	<i>AGL78</i>	4,21	2,52	0,60

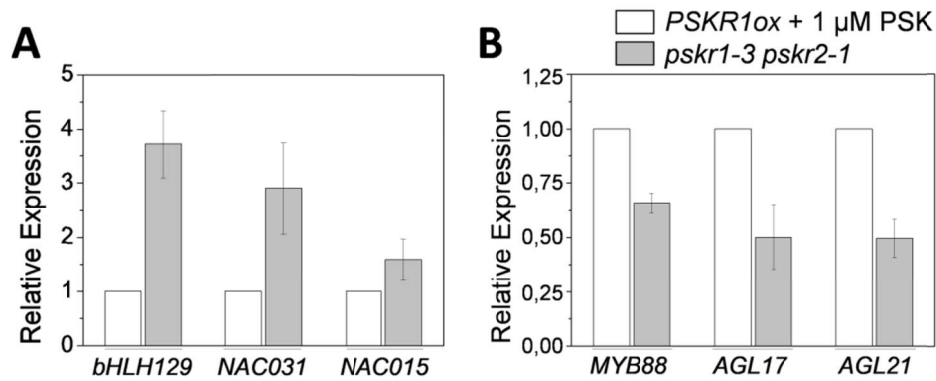


Abbildung 69: Bestätigung der Regulation von Genexpressionsveränderungen durch PSK anhand von qRT-PCR.

Von fünf Tage alten Keimlingen der Linien *PSKR1ox*, behandelt mit 1 µM PSK, und *pskr1-3 pskr2-1* wurden 5 mm der Wurzelspitze für qRT-PCR-Analysen verwendet. Expressionsveränderungen wurden für die Gene *bHLH129*, *NAC031*, *NAC015*, *MYB88*, *AGL17* und *AGL21* untersucht. Die Werte der *PSKR1ox*-Expression wurden auf 1 gesetzt. Werte sind Mittelwerte (± SE) aus vier unabhängigen Experimenten. Durchgeführt und ausgewertet von Stührwohldt, N. (AG Sauter).

A TFs, deren Expression durch PSK induziert wird.

B TFs, deren Expression durch PSK reprimiert wird.

zu Kapitel 3.2.2

Tabelle 20: Literaturrecherche zu PSK-regulierten Transkriptionsfaktoren.

Angegeben sind Quellen, die als Grundlage für eine Einordnung der PSK-regulierten TFs in unterschiedliche Gruppen bezüglich ihrer Funktion und Einbindung in unterschiedliche biologische Prozesse (vgl. Tabelle 6) und deren Beschreibung dienen. *DOF1.2* wurde bisher nicht beschrieben. Sortiert nach Genlokus.

Genbezeichnung	Genlokus	Literatur
<i>STZ/ZAT10</i>	At1g27730	Lippuner <i>et al.</i> (1996); Iida <i>et al.</i> (2000); Sakamoto <i>et al.</i> (2000); Gong <i>et al.</i> (2001); Lee <i>et al.</i> (2002); Mittler <i>et al.</i> (2004); Sakamoto <i>et al.</i> (2004); Davletova <i>et al.</i> (2005a); Davletova <i>et al.</i> (2005b); Ramonell <i>et al.</i> (2005); Taki <i>et al.</i> (2005); Gadjev <i>et al.</i> (2006); Mittler <i>et al.</i> (2006); Libault <i>et al.</i> (2007); Rossel <i>et al.</i> (2007); Pauwels <i>et al.</i> (2008); Bai <i>et al.</i> (2009); Zhou <i>et al.</i> (2009); Nguyen <i>et al.</i> (2012); Dubois <i>et al.</i> (2013); Xie <i>et al.</i> (2013); Li <i>et al.</i> (2014); Munekage <i>et al.</i> (2015); van Buer <i>et al.</i> (2016); Geilen <i>et al.</i> (2017); Huang <i>et al.</i> (2018)
<i>NAC015/BRN1</i>	At1g33280	Bennett <i>et al.</i> (2010); Kamiya <i>et al.</i> (2016)
<i>NAC031/CUC3</i>	At1g76420	Aida <i>et al.</i> (1997); Takada <i>et al.</i> (2001); Vroemen <i>et al.</i> (2003); Belles-Boix <i>et al.</i> (2006); Hibara <i>et al.</i> (2006); Lee <i>et al.</i> (2009a); Li <i>et al.</i> (2010b); Hasson <i>et al.</i> (2011); Lie <i>et al.</i> (2012); Burian <i>et al.</i> (2015); Gonçalves <i>et al.</i> (2015); Balkunde <i>et al.</i> (2017); Espinosa-Ruiz <i>et al.</i> (2017); Koyama <i>et al.</i> (2017)

<i>MYB88</i>	At2g02820	Lai <i>et al.</i> (2005); Ohashi-Ito & Bergmann (2006); Xie <i>et al.</i> (2010b); Vanneste <i>et al.</i> (2011); Makkena <i>et al.</i> (2012); Lee <i>et al.</i> (2013); Yang <i>et al.</i> (2014); Abbas <i>et al.</i> (2015); Chen <i>et al.</i> (2015); Lei <i>et al.</i> (2015); Wang <i>et al.</i> (2015a); Xie <i>et al.</i> (2017); Xu <i>et al.</i> (2017)
<i>HB24/ZHD6</i>	At2g18350	Tan & Irish (2006); Hong <i>et al.</i> (2011)
<i>GAZ</i>	At2g18490	Lee <i>et al.</i> (2016)
<i>AGL17</i>	At2g22630	Burgeff <i>et al.</i> (2002); Czechowski <i>et al.</i> (2004); De Folter <i>et al.</i> (2005); Gan <i>et al.</i> (2005); Han <i>et al.</i> (2008); Alvarez-Buylla <i>et al.</i> (2010)
<i>bHLH129</i>	At2g43140	Lee <i>et al.</i> (2007a); Tian <i>et al.</i> (2015)
<i>ERF72/EBP/RAP2.3</i>	At3g16770	Büttner & Singh (1997); Brenner <i>et al.</i> (2005); Ogawa <i>et al.</i> (2005); Govrin <i>et al.</i> (2006); Blödner <i>et al.</i> (2007); Ogawa <i>et al.</i> (2007); Li <i>et al.</i> (2008); Gibbs <i>et al.</i> (2011); Chen <i>et al.</i> (2014); Gibbs <i>et al.</i> (2014); Marín-de la Rosa <i>et al.</i> (2014); Deslauriers <i>et al.</i> (2015); Papdi <i>et al.</i> (2015); Gasch <i>et al.</i> (2016); Liu <i>et al.</i> (2017); Yao <i>et al.</i> (2017)
<i>NAC068/NTM1/NTL12</i>	At4g01540	Kim <i>et al.</i> (2006); Kim & Park (2007)
<i>PDF2</i>	At4g04890	Tanaka <i>et al.</i> (2002); Abe <i>et al.</i> (2003b); Kamata <i>et al.</i> (2013); San-Bento <i>et al.</i> (2013); Rombolá-Caldentey <i>et al.</i> (2014); Ogawa <i>et al.</i> (2015)
<i>AGL21</i>	At4g37940	Burgeff <i>et al.</i> (2002); Czechowski <i>et al.</i> (2004); De Folter <i>et al.</i> (2005); Gan <i>et al.</i> (2005); Alvarez-Buylla <i>et al.</i> (2010); Koizumi <i>et al.</i> (2011); Yu <i>et al.</i> (2014); Yu <i>et al.</i> (2017)
<i>ERF003/ESE3</i>	At5g25190	Sánchez <i>et al.</i> (2004); Lee <i>et al.</i> (2005); Cao <i>et al.</i> (2006); Che <i>et al.</i> (2006); Nakano <i>et al.</i> (2006b); Hectors <i>et al.</i> (2007); Kleine <i>et al.</i> (2007); Xin <i>et al.</i> (2007); Cai & Lashbrook (2008); Huang <i>et al.</i> (2008); Zhang <i>et al.</i> (2011)
<i>WRKY48</i>	At5g49520	Lee <i>et al.</i> (2007b); Vanderauwera <i>et al.</i> (2005); Ma <i>et al.</i> (2006); Qutob <i>et al.</i> (2006); Lee <i>et al.</i> (2007b); Kim <i>et al.</i> (2008); Xing <i>et al.</i> (2008); Gao <i>et al.</i> (2013); Gao & He (2013); Thieme <i>et al.</i> (2015)
<i>ERF104</i>	At5g61600	Ko <i>et al.</i> (2004); Cominelli <i>et al.</i> (2005); Tohge <i>et al.</i> (2005); Cao <i>et al.</i> (2006); Nakano <i>et al.</i> (2006a); Zhu <i>et al.</i> (2006); Osuna <i>et al.</i> (2007); Ferreira <i>et al.</i> (2008); Usadel <i>et al.</i> (2008); Bethke <i>et al.</i> (2009); Etchells <i>et al.</i> (2012); Moore <i>et al.</i> (2014); Vogel <i>et al.</i> (2014)

zu Kapitel 3.2.3

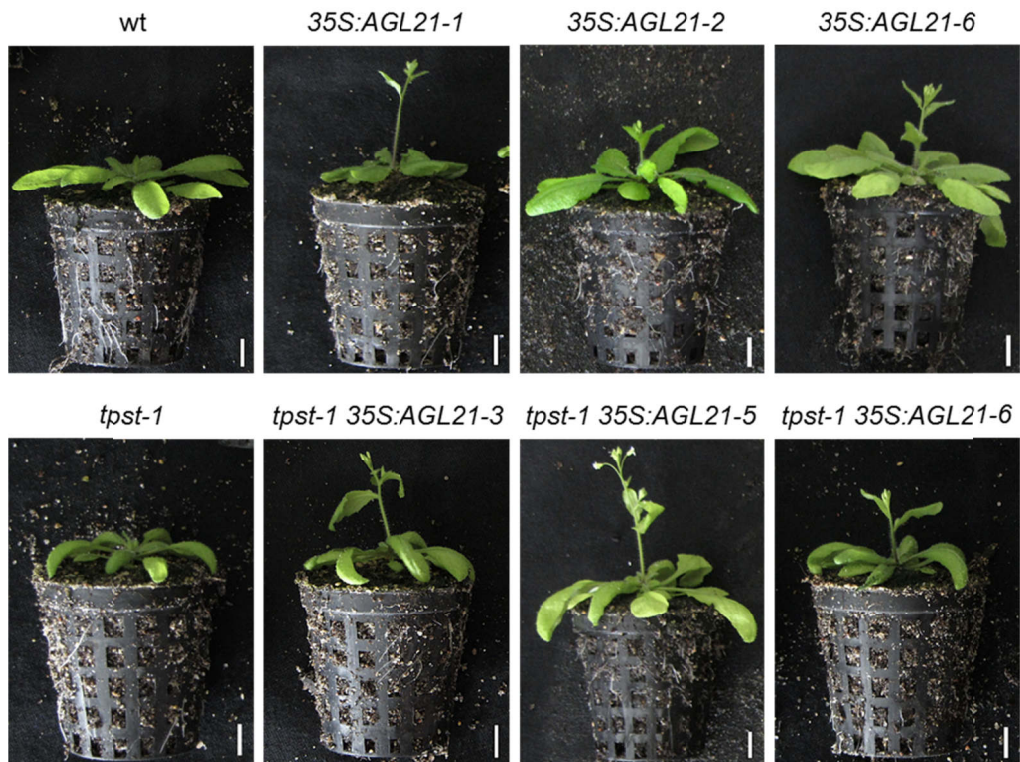


Abbildung 70: Verfrühter Übergang in Blühphase bei Überexpression von AGL21.

Vier Wochen alte AGL21-Überexpressionslinien im Wildtyp- (35S:AGL21-1, 35S:AGL21-2 und 35S:AGL21-6) und *tpst-1*-Hintergrund (*tpst-1* 35S:AGL21-3, *tpst-1* 35S:AGL21-5 und *tpst-1* 35S:AGL21-6) zeigten einen früheren Übergang in die generative Phase. Messbalken entsprechen 1 cm.

zu Kapitel 3.2.4

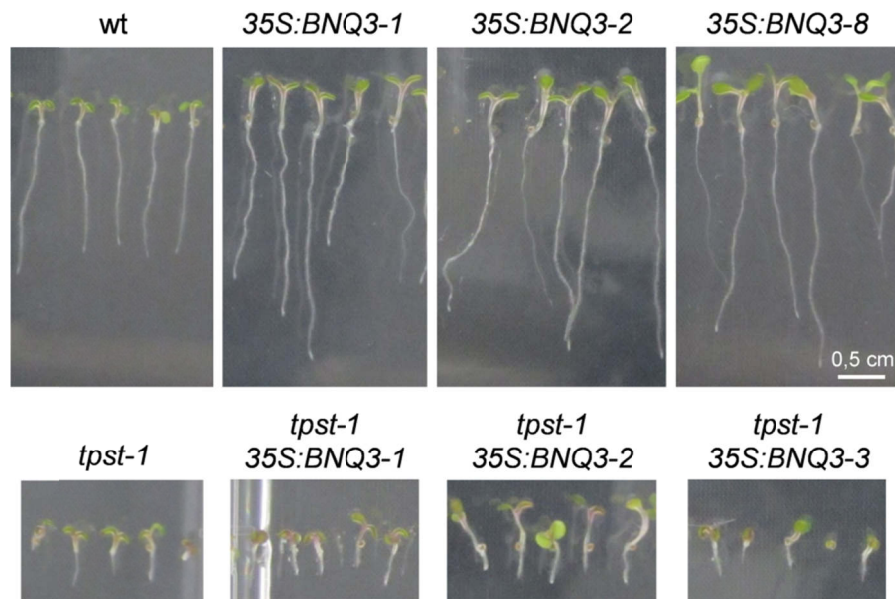


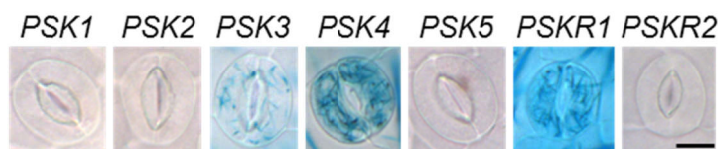
Abbildung 71: BNQ3-Überexpression bewirkt verstärktes Wachstum des Hypokotyls.

Fünf Tage alte BNQ3-Überexpressionslinien im Wildtyp- (35S:BNQ3-1, 35S:BNQ3-2 und 35S:BNQ3-8) und tpst-1-Hintergrund (tpst-1 35S:BNQ3-1, tpst-1 35S:BNQ3-2 und tpst-1 35S:BNQ3-3) zeigten elongiertes Hypokotyl.

zu Kapitel 4.4

Tabelle 21: PSK- und ABA-abhängige Regulation der Pathogenantwort stimmen meist überein.

Pathogen	Lebensweise nekrotroph (N) oder (hemi-) biotroph (B)	Hormon (PSK oder ABA)	Pathogen- abwehr unterstützt (+) oder reduziert (-)	Quelle
<i>Alternaria brassicicola</i>	N	PSK	+	(Loivamäki <i>et al.</i> , 2010; Mosher <i>et al.</i> , 2013)
		ABA	+	(Mazumder <i>et al.</i> , 2013; Meur <i>et al.</i> , 2015)
<i>Botrytis cinerea</i>	N	PSK	+	(Zhang <i>et al.</i> , 2018b)
		ABA	+	(Achoo & Höfte, 2006)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	N	PSK	+	(Loivamäki <i>et al.</i> , 2010)
		ABA	+	(Guo & Stotz, 2010; Perchepied <i>et al.</i> , 2010)
<i>Fusarium oxysporum</i>	N	PSK	+	(Shen & Diener, 2013)
		ABA	- / +	(Di <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	N	PSK	+	(Rodiuc <i>et al.</i> , 2016)
		ABA	-	(Zhou <i>et al.</i> , 2008)
<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	B	PSK	-	(Rodiuc <i>et al.</i> , 2016)
		ABA	-	(Fan <i>et al.</i> , 2009)
<i>Pseudomonas syringae</i>	B	PSK	-	(Igarashi <i>et al.</i> , 2012; Mosher <i>et al.</i> , 2013)
		ABA	-	(Mohr & Cahill, 2007; Yasuda <i>et al.</i> , 2008; de Torres Zabala <i>et al.</i> , 2009; Fan <i>et al.</i> , 2009; Ton <i>et al.</i> , 2009)

Abbildung 72: *PSK3*, *PSK4* und *PSKR1* sind in Stomata exprimiert.

Zehn Tage alte Keimlinge der Linien *PSK1:GUS-3*, *PSK2:GUS-2*, *PSK3:GUS-3*, *PSK4:GUS-4*, *PSK5:GUS-1*, *PSKR1:GUS-4*, *PSKR2:GUS-3* wurden auf ihre GUS-Aktivität in den Stomata der zwei ersten echten Blättern unter Kontrollbedingungen untersucht. Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten. Messbalken 20 µm.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Dissertation „Regulation der osmotischen Stressantwort durch den Phytosulfokinsignalweg in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Arabidopsis“, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin Frau Prof. Dr. Margret Sauter, nach Inhalt und Form meine eigenständige und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasste Arbeit ist. Die Dissertation wurde an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Teile von Kapitel 3.1 wurden zur Veröffentlichung eingereicht. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

Kiel, den

Martina Diana Schönhof

Danksagung

Meine Doktorandenzeit war eine Reise, auf der ich sehr viel gelernt habe und ich möchte allen Menschen danken, die ich auf diesem Weg kennengelernt habe und die mich bis hierhin begleitet haben.

Ich danke Frau Prof. Dr. Sauter für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des Themas meiner Arbeit und die Finanzierung des Projekts. Ich danke Ihr für den wissenschaftlichen Austausch, dafür, dass sie mir die Möglichkeit gab, an Tagungen teilzunehmen und für die Korrekturvorschläge für diese Arbeit.

Ich danke meinen lieben Laborkollegen und Freunden für ihre Hilfsbereitschaft und das immer offene Ohr. Insbesondere danke ich Tanja, Timo, Michael, Emese und Christine - der Reihenfolge nach, in der ich sie kennenlernen durfte. Ohne eure Anregungen, Korrekturen und eure Diskussionsbereitschaft beim Schreibprozess und die stetige Unterstützung im Labor hätte ich es sicherlich nicht bis hier geschafft. Da das Leben aber nicht nur aus Arbeit besteht, danke ich euch für die neuen Haarschnitte und Känguruzitate, das Sackhüpfen und die Spieleabende, die Fahrradreparaturen und weisen Worte, die Spaziergänge und das hervorragende Essen, das Meeresleuchten und die Motivation und vor allem für die schöne Zeit, die ich mit euch verbringen durfte.

Ich danke meinen zahlreichen Mitbewohnern für die Rücksicht, den Ausgleich und die vielen schönen Dinge, die wir zusammen gesehen, gegessen und unternommen haben. Ein besonderer Dank geht hierbei an Moritz, Celia, Melina, Nicolas, Iván und Michaela.

Zuletzt möchte ich meiner gesamten Familie für den Rückhalt danken, den ich zeitweise wirklich nötig hatte, für das wunderbare Kinderchaos, den Zusammenhalt, die aufmunternden Worte und dafür, dass ihr immer für mich da seid.