



Udo Junghans (Autor)

**Anatomische und molekularebiologische  
Untersuchungen zur Auxinphysiologie in der  
Graupappel (*Populus x canescens* Sm.) und  
*Arabidopsis thaliana* (L.)**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2393>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verwendete Abkürzungen.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Ziele der Arbeit.....	8
2 Material & Methoden.....	9
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	9
2.2 RNA Techniken.....	12
2.2.1 DEPC Wasser.....	12
2.2.2 RNA-Extraktion nach Chang et al. (1993) .....	12
2.2.3 RNA-Extraktion mit TRI-Reagenz .....	13
2.2.4 Entfernung von DNA .....	14
2.2.5 Aufreinigung von RNA.....	14
2.2.6 10x MEA-Puffer.....	14
2.2.7 RNA Ladepuffer 2x.....	14
2.2.8 RNA Gele.....	15
2.2.9 cDNA Synthese.....	15
2.3 DNA Techniken.....	16
2.3.1 10x TBE Puffer.....	16
2.3.2 Extraktion von DNA.....	16
2.3.3 Extraktion von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse von E. coli nach Birnboim (1983, modifiziert).....	16
2.3.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	17
2.3.5 PCR.....	17
2.3.6 Expressionsanalyse mit Realtime PCR.....	19
2.3.7 Primer.....	21
2.3.8 Aufreinigung von Fragmenten aus der PCR.....	23
2.3.9 10x DNA Ladepuffer.....	23
2.3.10 DNA Gele.....	23
2.3.11 Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Gelen.....	24
2.3.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	24
2.3.13 Restriktionsverdau von DNA.....	25
2.3.14 Ligation von DNA-Fragmenten.....	25
2.3.14.1 Vorbereitung der DNA-Fragmente für die Ligation.....	26
2.3.14.2 Vorbereitung des Vektors für die Ligation.....	28
2.3.14.3 Ligation.....	28
2.3.15 Isolation von PclL3.....	29
2.3.16 Isolation von PclL3 und PclAR3.....	30
2.3.17 Isolation der Teilsequenz von PclLR1.....	30
2.4 Kultivierung von Escherichia coli .....	31
2.4.1 LB-Medium.....	31

2.4.2	LB-Platten.....	31
2.4.3	SOB-Medium.....	31
2.4.4	SOB-Platten.....	32
2.4.5	SOC-Medium.....	32
2.4.6	Herstellung elektrokompenter Escherichia coli Zellen.....	32
2.4.7	Elektrotransformation .....	33
2.4.7.1	Transformation von E. coli mit den rekombinanten Plasmiden pPCV702 int PciLL3 und pPCV702 int PciAR3.....	34
2.4.8	E. coli Stammkulturen.....	34
2.5	Kultivierung von Agrobacterium tumefaciens .....	34
2.5.1	YEB-Medium.....	34
2.5.2	Platten mit YEB-Medium.....	35
2.5.3	Herstellung elektrokompenter Agrobacterium tumefaciens-Zellen.....	35
2.5.4	Transformation von Agrobacterium tumefaciens mit den rekombinanten Plasmiden pPCV702 int PciLL3 und pPCV702 int PciAR3.....	36
2.6	Kultivierung von Arabidopsis thaliana.....	36
2.6.1	Kulturmedium für Arabidopsis thaliana.....	36
2.6.2	Samengewinnung bei Arabidopsis thaliana .....	37
2.6.3	Sterilisierung von Arabidopsis thaliana Samen.....	38
2.6.4	Selektionsplatten für Arabidopsis thaliana.....	38
2.6.5	Transformation von Arabidopsis thaliana mit den rekombinanten Plasmiden nach der floral dip Methode von Clough und Bent (1998).....	38
2.6.6	Screening nach positiv transformierten homozygoten Samen.....	39
2.6.7	Screening nach homozygoten Knockout-Mutanten der SALK-Linie 57304.....	40
2.6.8	Untersuchung der Holzbildung im Hypokotyl der Arabidopsis thaliana Knockout-Mutante SALK 57304.....	40
2.6.9	Untersuchungen zu Keimrate, Wurzelwachstum und Biomasseproduktion der Arabidopsis thaliana Knockout-Mutante SALK 57304.....	41
2.6.10	Untersuchungen zum Vermögen der transgenen Linien 35S:PciLL3 und 35S:PciAR3, Auxinkonjugate verstärkt als Auxinquelle zu nutzen.....	41
2.7	Kultivierung von Populus x canescens und Populus alba.....	42
2.7.1	Vermehrungsmedium.....	42
2.7.2	Bewurzelungsmedium.....	43
2.7.3	Hydrokultur von Populus x canescens und Populus alba.....	44
2.7.4	Kultivierung von Populus x canescens und Populus alba auf Erde.....	45
2.8	Hormonversuche mit Arabidopsis thaliana und Populus x canescens.....	45
2.8.1	Test des Verhaltens der Wurzeln von Arabidopsis thaliana gegenüber Auxinkonjugaten.....	45
2.8.2	Test des Verhaltens der Wurzeln von Populus x canescens gegenüber Auxinkonjugaten.....	46
2.8.3	Färbung von Teilen transgener GH3:gus-Pflanzen.....	46
2.8.4	Wirkung von Ethrel auf das kambiale Wachstum von Populus alba.....	47

2.8.5	Wirkung von Morphactin und NPA auf das kambiales Wachstum.....	47
2.8.6	Wirkung des Auxinkonjugates IAA-Alanin auf das kambiales Wachstum.....	48
2.9	Mikroskopietechniken.....	48
2.9.1	FAE.....	48
2.9.2	Einbettung in Rotiplast für Mikrotomschnitte.....	48
2.9.3	Herstellung von Mikrotomschnitten.....	49
2.9.4	DEPEX .....	49
2.9.5	Färbemethoden.....	50
2.9.5.1	Toluidinblau.....	50
2.9.5.2	Berberinsulfatfärbung.....	50
2.9.5.3	Callosefärbung.....	50
2.9.5.4	Safranin-Astrablau-Färbung.....	50
2.9.6	Bildanalyse.....	50
2.9.7	Elektronenmikroskopie.....	51
2.10	Statistik.....	51
2.11	in silico Analyse von DNA-Sequenzen.....	51
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Auswirkungen der Applikation von Auxintransportinhibitoren oder Auxinamidokonjugaten auf Pflanzengewebe .....	53
3.1.1	Wirkung von Ethrel auf das kambiales Wachstum von <i>Populus alba</i> .....	53
3.1.2	Wirkung der Auxintransportinhibitoren Morphactin und NPA auf das kambiales Wachstum.....	57
3.1.3	Änderung der Gefäßdifferenzierung durch IAA-Alanin.....	60
3.1.4	Reaktion der Wurzeln von <i>Populus x canescens</i> Stecklingen und <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Auxinkonjugate.....	61
3.1.5	Nutzung von Auxinkonjugaten als Auxinquelle in Blättern von transgenen <i>Populus x canescens</i> .....	64
3.2	Auxinamidokonjugathydrolasen.....	66
3.2.1	Beschreibung der Sequenzen der untersuchten Auxinamidokonjugat- hydrolasen.....	66
3.2.2	Sequenzunterschiede zwischen PcILL3, PeILL3, PciAR3 und bereits veröffentlichten Auxinamidohydrolasesequenzen.....	68
3.2.3	Intron-Exon-Struktur von PcILL3 und PciAR3.....	76
3.2.4	Expression der Auxinamidohydrolasen im Jahreslauf.....	76
3.2.5	Expression der Auxinamidohydrolasen in einzelnen Organen der Pappel <i>Populus x canescens</i> .....	78
3.2.6	Überexpression von PcILL3 und PciAR3 unter Steuerung des CaMV 35S Promotors in <i>Arabidopsis thaliana</i> („Gain of function“). .....	79
3.2.6.1	Nachweis der transformierten cDNA im Genom von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	79
3.2.6.2	Reaktion der transgenen Linien 35S:PcILL3 und 35S:PciAR3 auf Auxinamidokonjugate.....	80

3.3	Charakterisierung einer Arabidopsis thaliana ill3-Knockout Mutante.....	83
3.3.1	Nachweis der Insertion der T-DNA ins Genom.....	83
3.3.2	Keimraten.....	84
3.3.3	Hypokotyl- und Wurzellängenentwicklung .....	85
3.3.4	Biomasseproduktion unter Kurz- und Langtagbedingungen.....	85
3.3.5	Stengelwachstum.....	86
3.3.6	Bildung von Xylem im Hypokotyl von Arabidopsis thaliana unter Kurztagbedingungen.....	86
4	Diskussion.....	89
4.1	Änderungen der Holzanatomie durch die Behandlung mit Ethrel, NPA und Morphactin.....	89
4.2	Wirkung von Auxin und Auxinamidokongjugaten auf die Entwicklung pflanzlicher Organe.....	93
4.3	Molekulare Charakterisierung von PeILL3, PcILL3 und PclAR3.....	96
4.4	ill3-Knockout (loss of function).....	98
4.5	Verstärkte Expression von PcILL3 und PclAR3 (gain of function).....	99
4.6	Ausblick.....	100
5	Zusammenfassung.....	101
6	Summary.....	103
7	Literaturverzeichnis.....	105
8	Anhang.....	117
8.1	Einbuchstabenkürzel der Aminosäuren nach NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry).....	117
8.2	Nukleotidkürzel des genetischen Codes (NC-IUB).....	117
8.3	Genbankeintrag von PeILL3.....	118
8.4	Genbankeintrag von PcILL3.....	119
8.5	Genbankeintrag von PclAR3.....	120
8.6	Teilsequenz von PclLR1.....	121
8.7	Korrigierte Sequenz von PtlAR3 (JGI-Pt: LG III1698).....	122
8.8	Aminosäurezusammensetzung der putativen Proteine von PeILL3, PcILL3, PclAR3 und AtlAR3 .....	124
	Publikationen.....	125
	Danksagung.....	126
	Lebenslauf.....	127