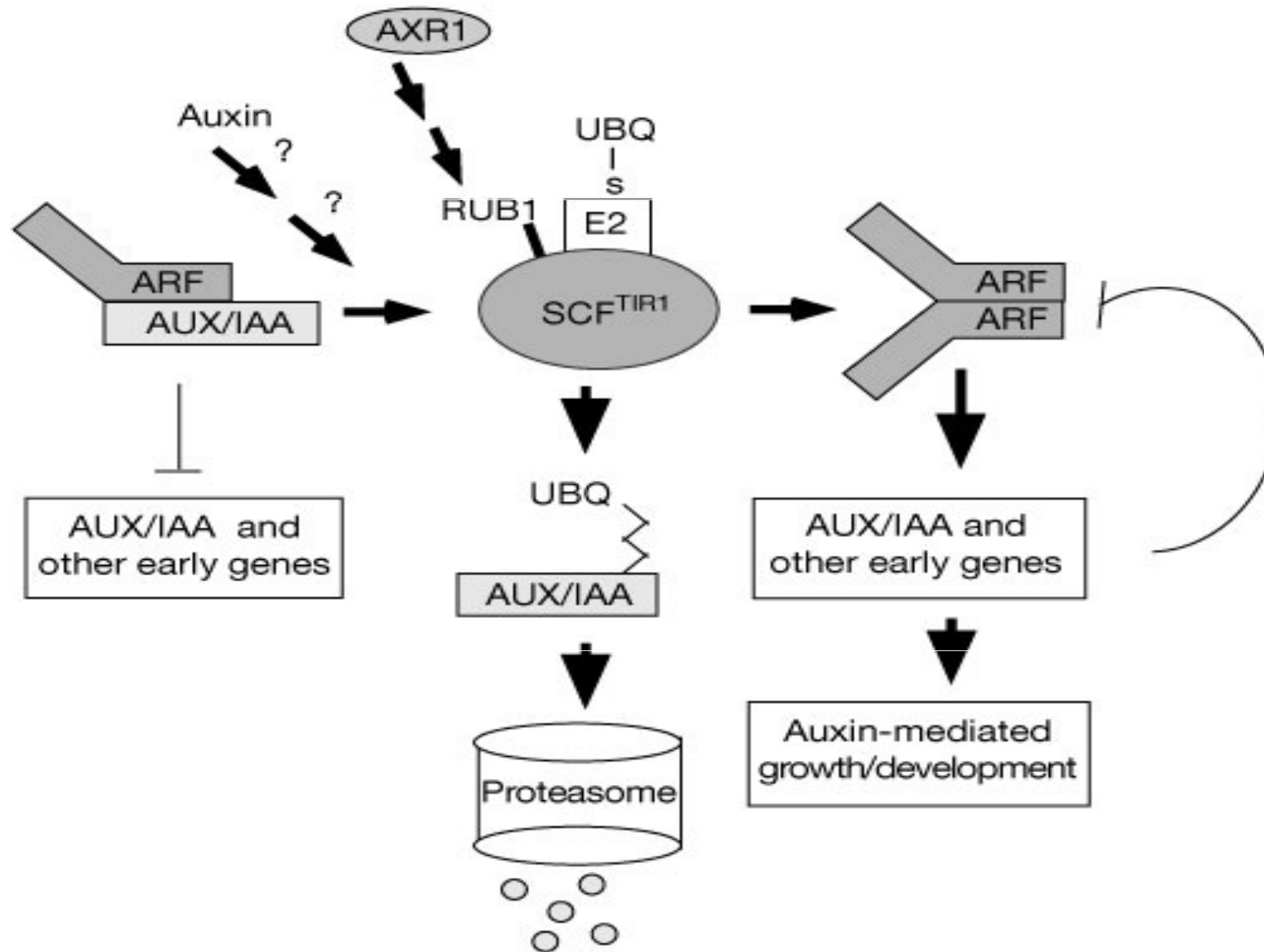
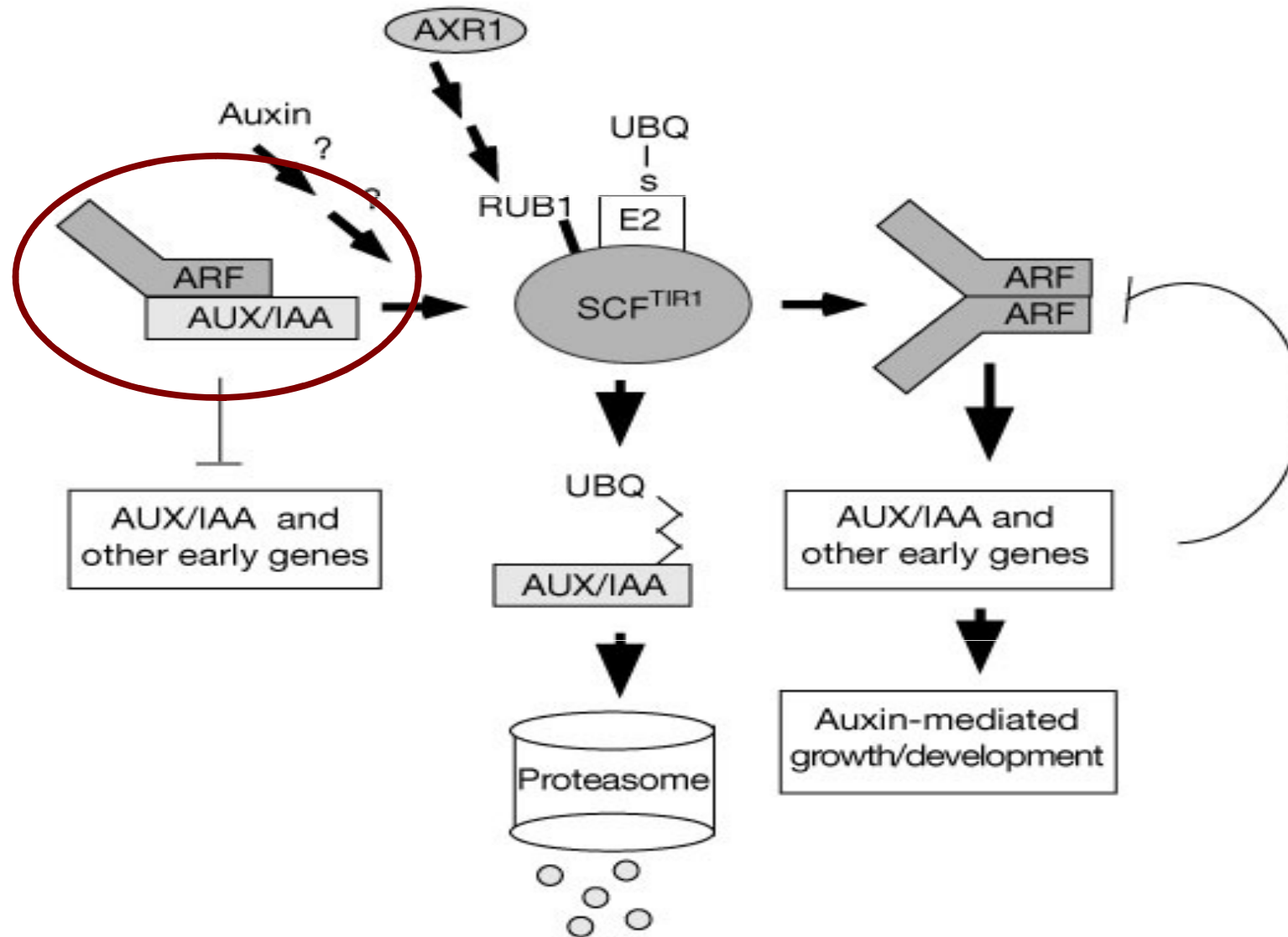


Einleitung



Einleitung



The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo

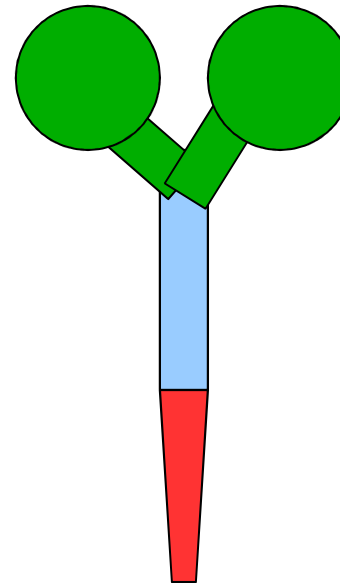
Thorsten Hamann, Ulrike Mayer and Gerd Jürgens*

Entwicklungsgenetik, ZMBP, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 1, D-72076 Tübingen, Germany

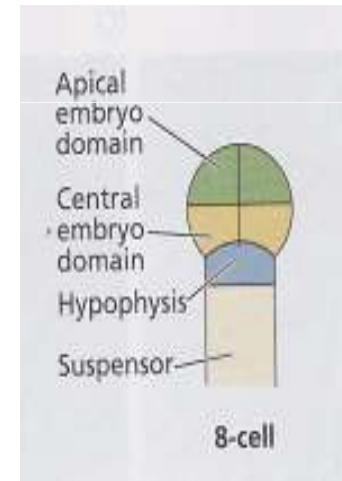
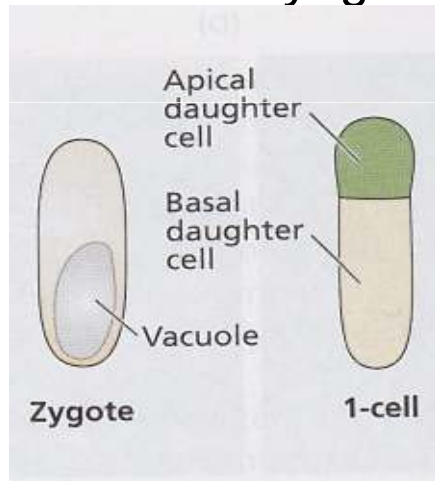
- Organisation von Pflanzen wird während der Embryogenese ausgebildet

Musterung:

- Apikal (Shootmeristem, Kotelydonen)
- Mitte (Hypokotyl, Wurzelmeristem)
- Basal (Wurzelmeristem)

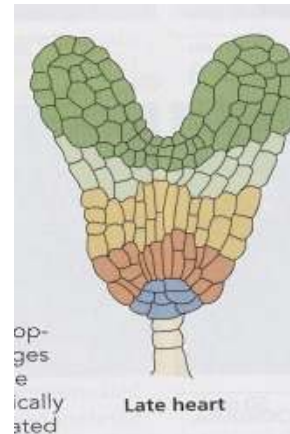
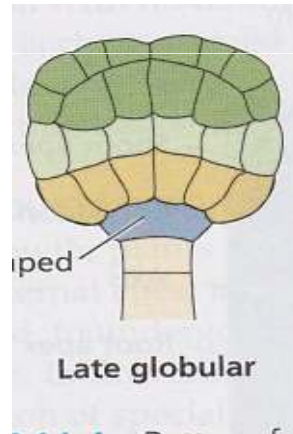
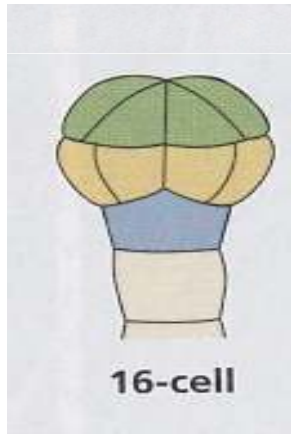


Ablauf der Embryogenese in *Arabidopsis*

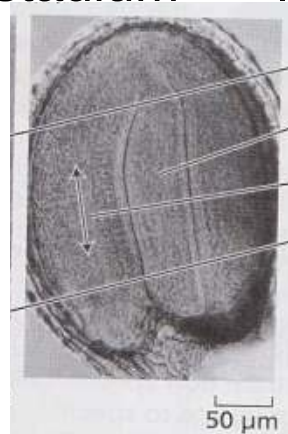


Zygote → 1-Zellstadium → 2-Zellstadium → 8-Zellstadium

Ablauf der Embryogenese in *Arabidopsis*



16-Zellstadium → Globularstadium → Herzstadium → Torpedostadium



→ mature Embryo

Welche Gene sind an der Organisation während der Embryogenese beteiligt?

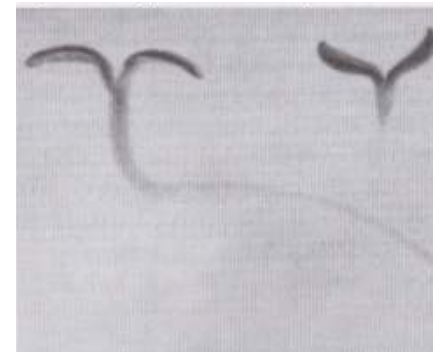
- Mutantenanalysen identifizierten mehrere Gene, die essentiell für die Apikal-Basal-Musterung während der Embryogenese sind

→ Screen nach *seedling defective* Mutanten

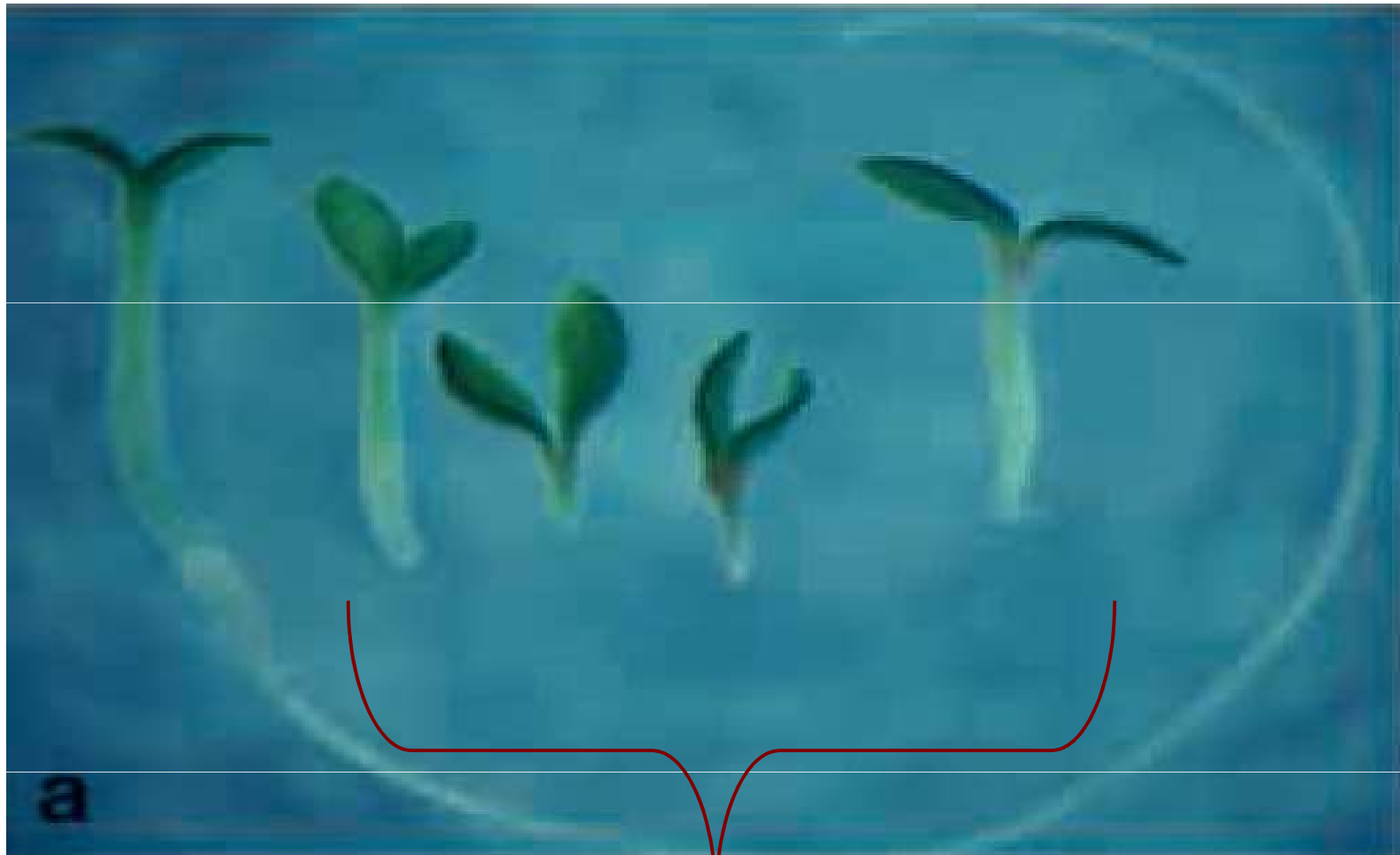


WT (Ler-ecotype)

EMS



Mutanten



WT

bdI

Table 1. Frequency of *bdI* seedlings from *bdI/BDL* plants of different ecotypes

Ecotype	Total no. of seedlings	Weak phenotype*	Strong phenotype*	One cotyledon	% mutant seedlings
<i>Ler</i> (self) [‡]	1,203	138	65	9	18
<i>Ler</i> (out) [§]	1,022	101	77	5	18
Col	522	81	21	0	20

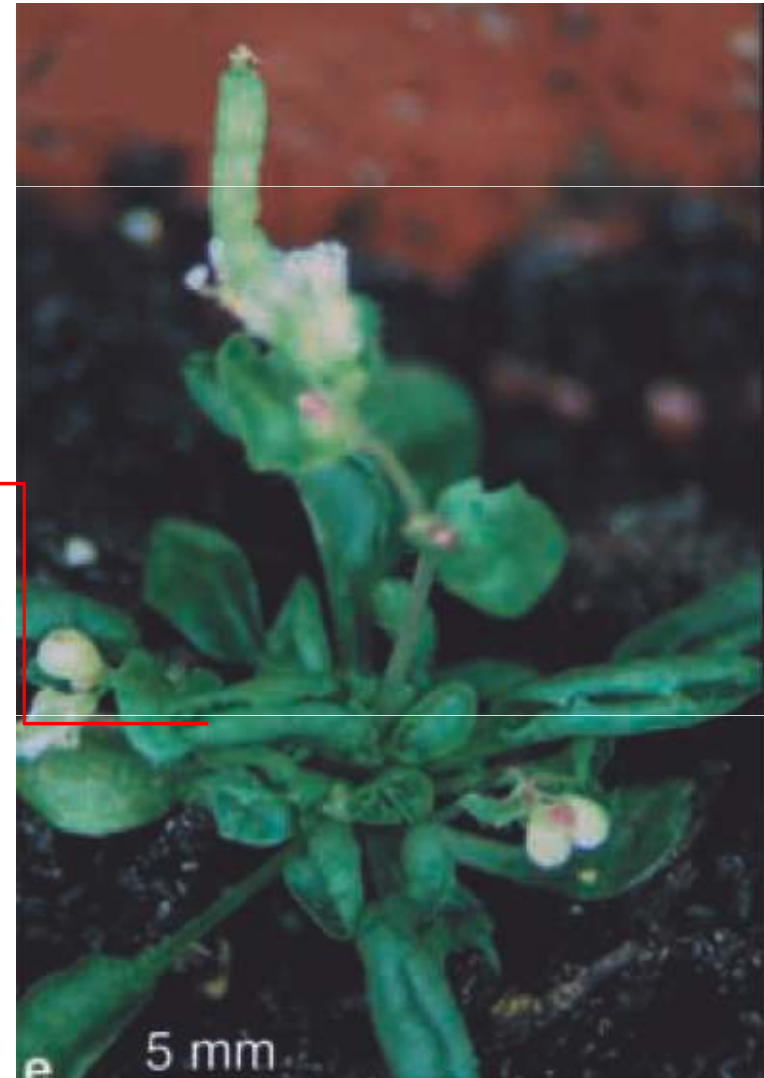
*See Fig. 1a.
[‡]Line maintained by selfing.
[§]After outcross with *Ler* wild type.

→ rezessive Mutation

Adulte *bd/* Pflanze:

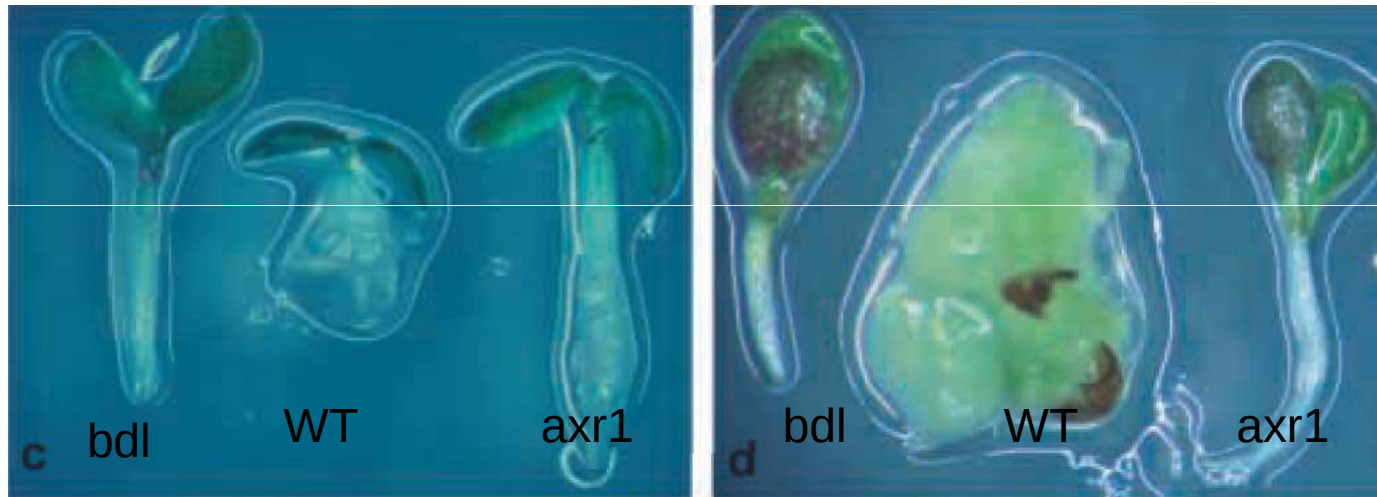
- Geringe Wuchshöhe
- Eingerollte Blätter und „buschiges“ Aussehen (Hinweis für Verlust der Apikaldominanz)

→ ähnelt *axr12* Pflanzen

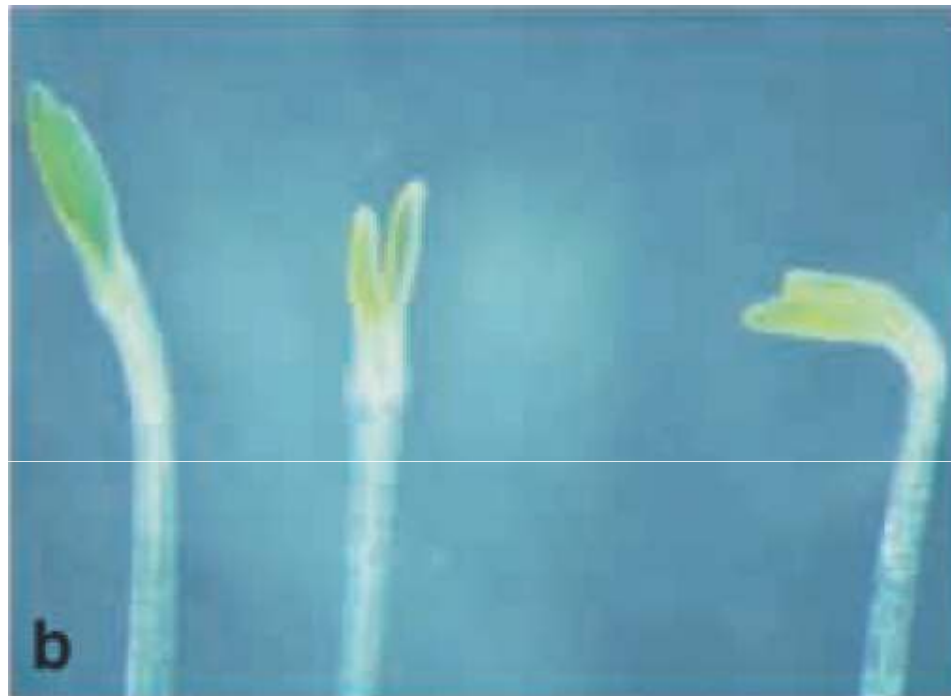


Welchen Einfluss hat Auxin auf den Phänotyp von *bdI* Pflanzen?

Behandlung mit 2,4-D, bzw.
callusinduzierendes Medium:



Keimlinge nach Anzucht im Dunkeln:



axr1

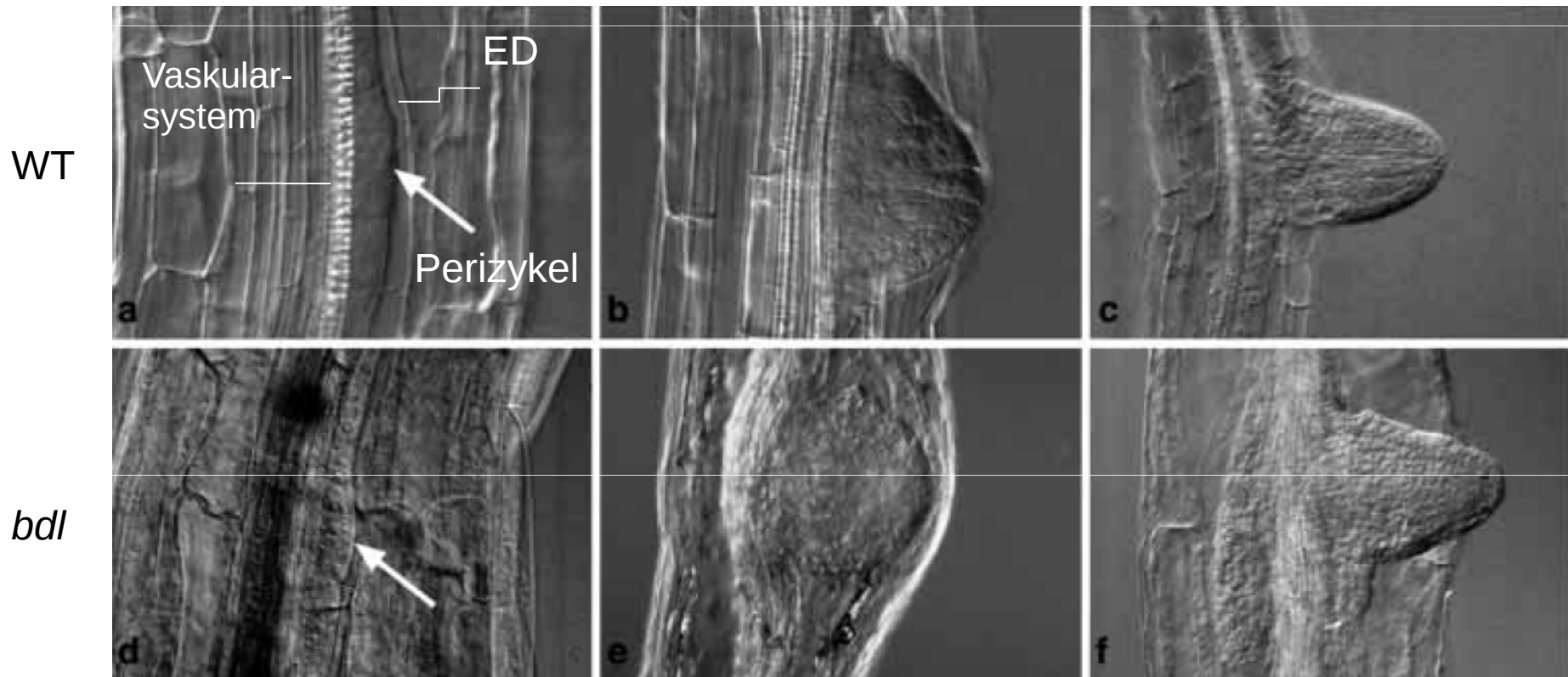
bdI

WT

→ *bdI*- Pflanzen müssen eine Veränderung im Auxinpathway haben

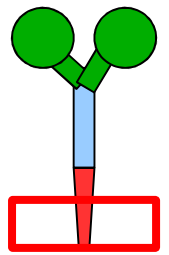
Wurzelwachstum in *bdI*-Pflanzen

Beeinflusst die *bdI*-Mutation die Bildung von Primär- und Sekundärwurzeln?

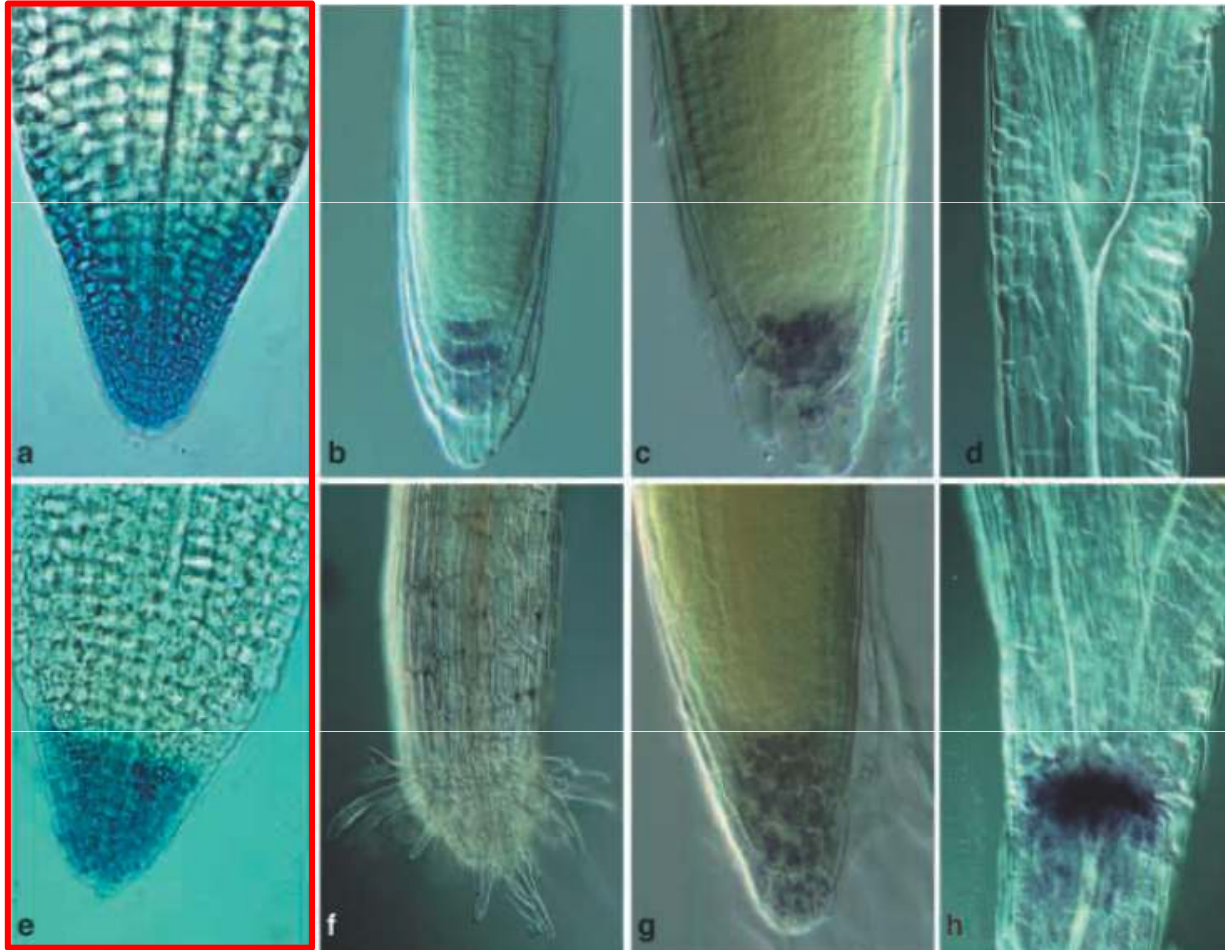


→ keine auffälligen Unterschiede zwischen WT und Mutante während der Lateralwurzelbildung

Welchen Effekt hat die Mutation auf reife *bdl*- Embryos und Keimlinge?



WT

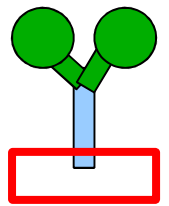


bdl

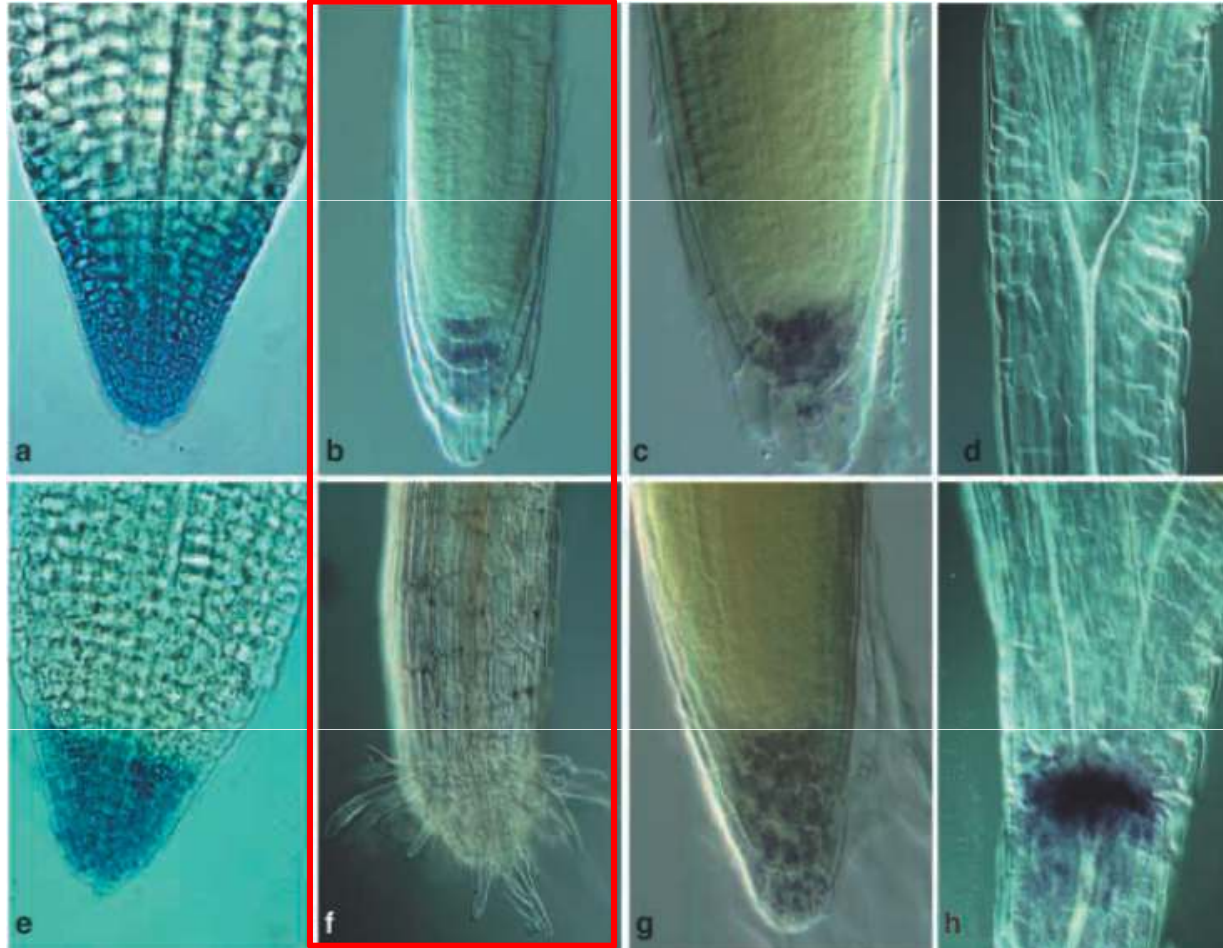
→ Verminderte GUS- Expression in *bdl*

Lugol-Färbung:

- besondere Form der Iod-Kaliumiodid-Lösung
 - Iod-Ionen lagern sich in Stärke- Moleküle der Amyloplasten ein
- Iodstärke absorbiert langwelliges Licht, nur blauviolett Licht wird zurückgesendet

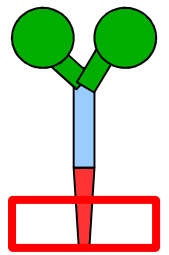


WT

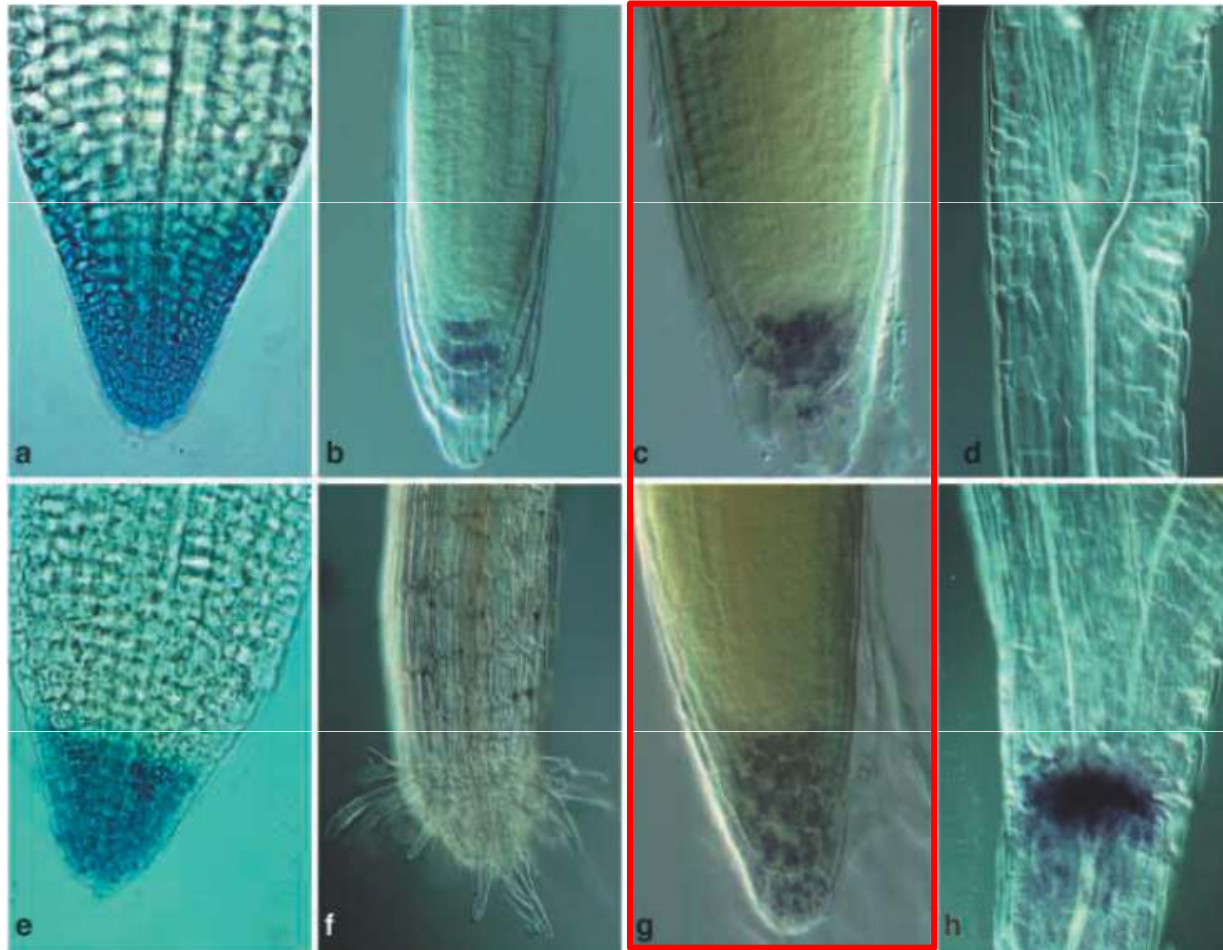


bdl

→ fehlender Stärkenachweis im basalem Ende des *bdl*-Keimlings lässt auf nicht vorhandene Wurzelhaube schließen

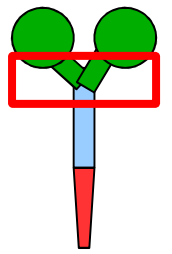


WT

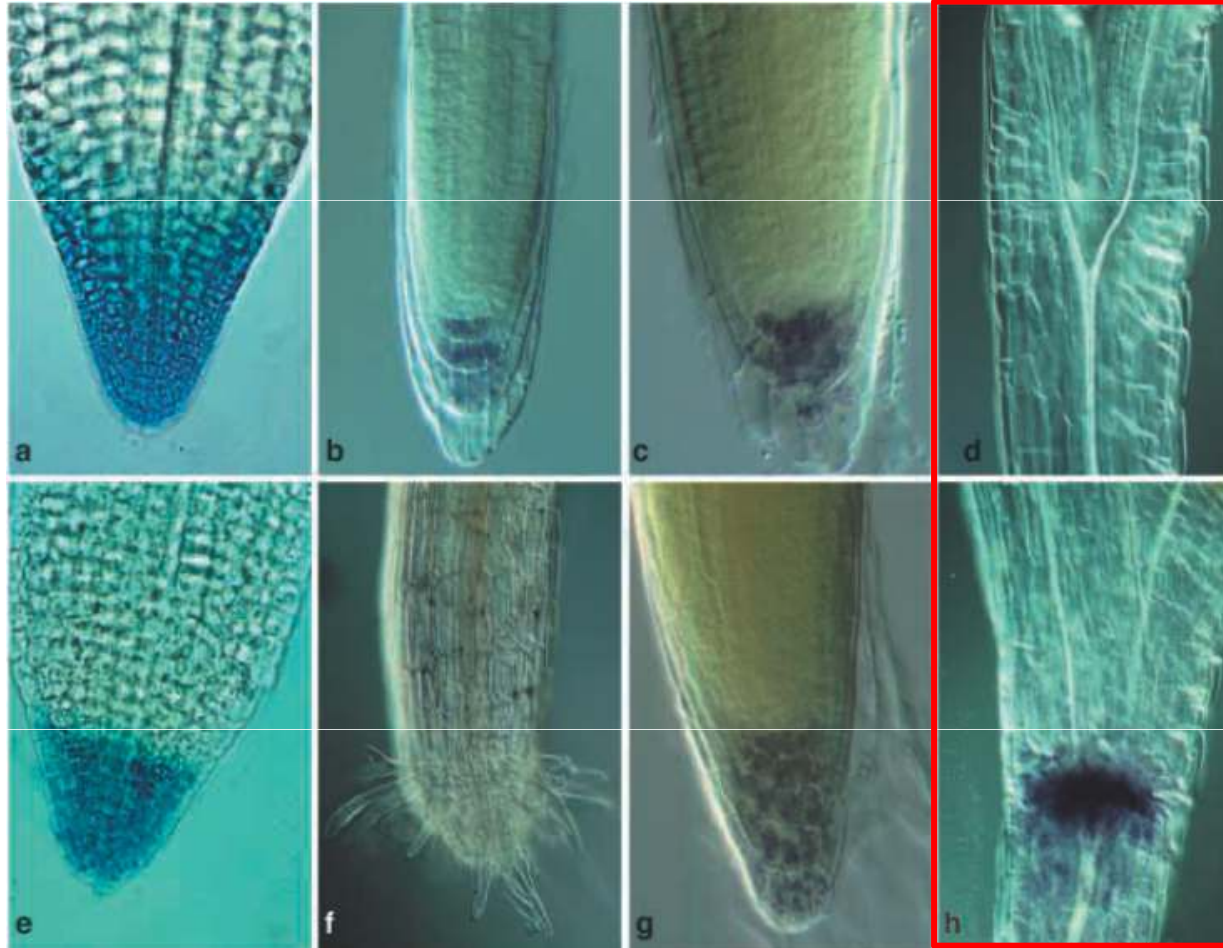


bdl

In den Lateralwurzeln hingegen, findet ein Stärkenachweis statt
 → Sekundärwurzelwachstum nicht durch *bdl* beeinflusst



WT



bdl

- vaskulärer Defekt, welcher Sucrose-Transport behindert
- Identitätsverlust der Zellen

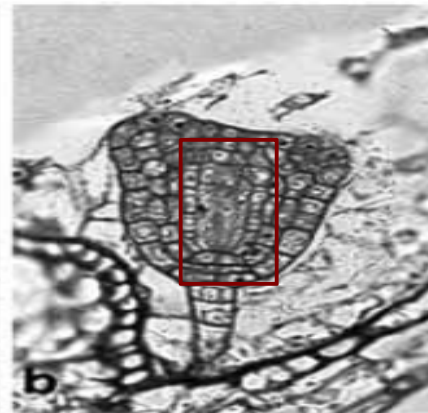
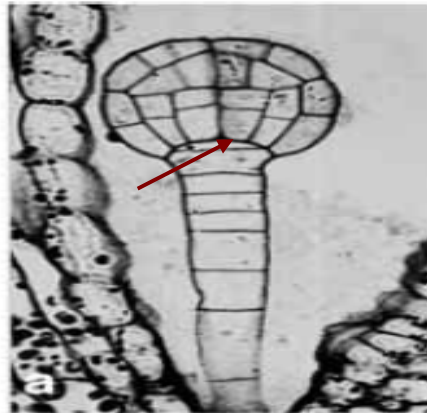
- Variabler Phänotyp → *bdl* Mutation keine 100%ige Penetranz
- »starker« Phänotyp : Fehlen des Hypokotyls, Primärwurzel
→ entspricht *mp* Phänotyp
- »schwacher« Phänotyp : Fehlen von Primärwurzel (Wurzelhaare am basalen Ende)
→ entspricht *hbt* Phänotyp
- Unter Auxinbehandlung (2,4-D) ähnlicher Phänotyp wie *axr1*
- Keine Callusbildung
- Kein *apikal hook*
→ Auxin Insensitivität
- Stärke-Akkumulation im apikalen Bereich, aber nicht im basalen Bereich
- Trotz Fehlen von Primärwurzel werden Lateralwurzeln ausgebildet

Wie ist das Fehlen der Primärwurzel in *bdl* Pflanzen erklärbar?

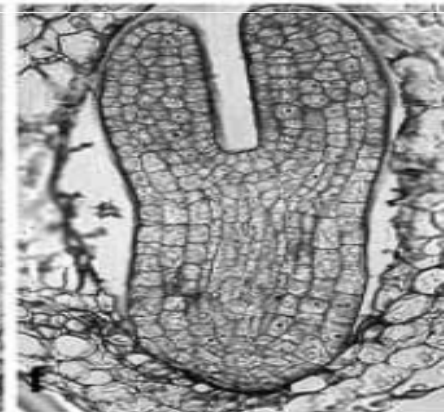
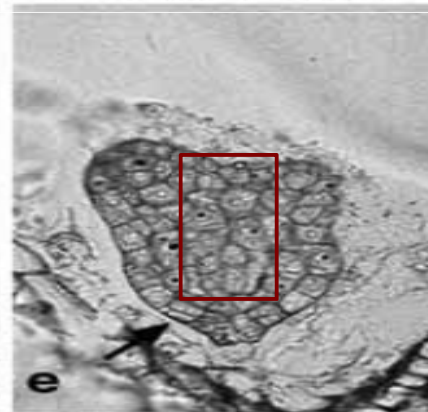
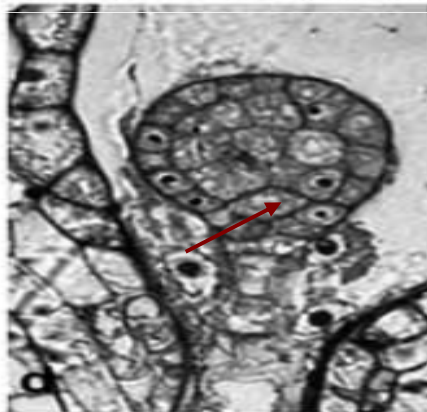
- Da Lateralwurzeln (postembryonal!) gebildet werden, aber keine Primärwurzel, muss der Phänotyp in der Embryogenese begründet sein

→ Analyse der Embryonalstadien

WT



bdI



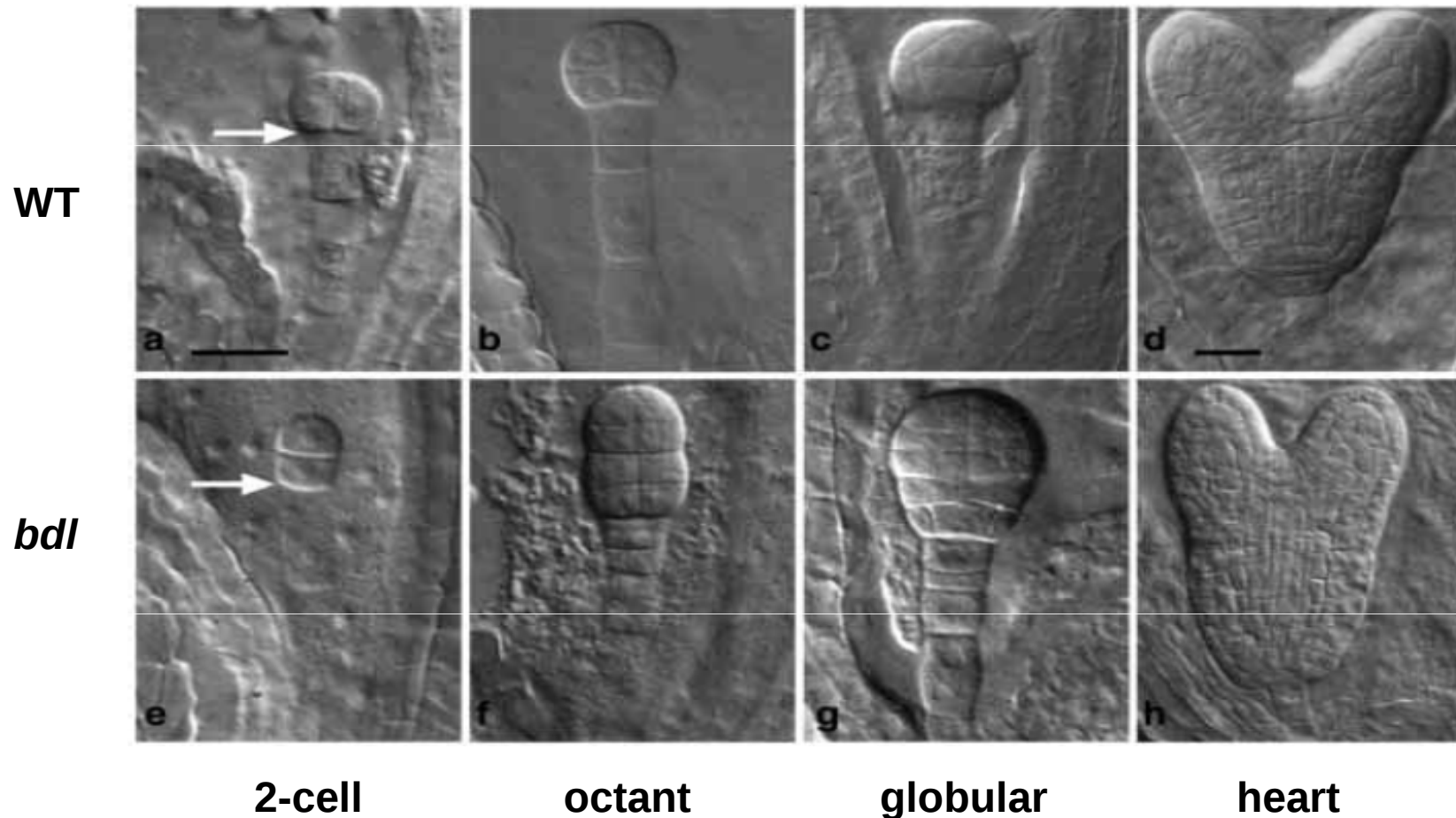
Globular

heart

torpedo

- Bereits im Globular-Stadium deutliche Unterschiede zum WT

→ *bdI* Defekt muss eher erfolgen



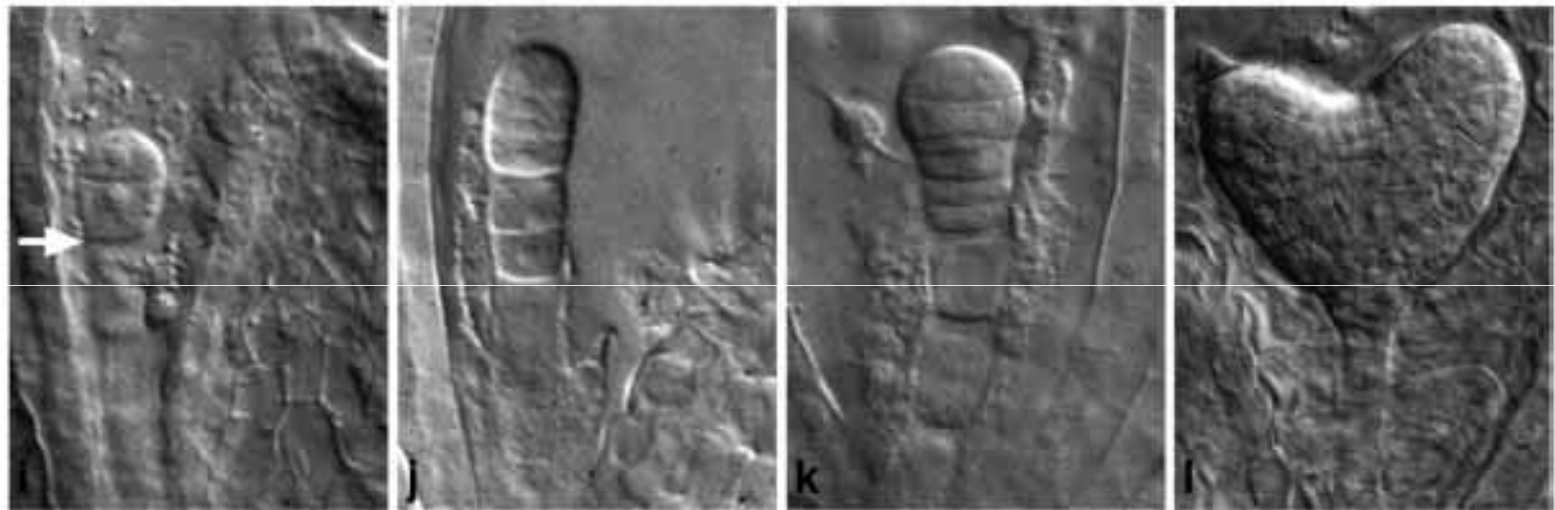
- Fehlerhafte Teilung im Zweizell-Stadium
- Horizontale Teilung statt vertikaler

Unterschiede zwischen „starken“ und „schwachen“ Phänotyp

bdI (Typ1)



bdI (Typ2)



2-cell

octant

globular

heart

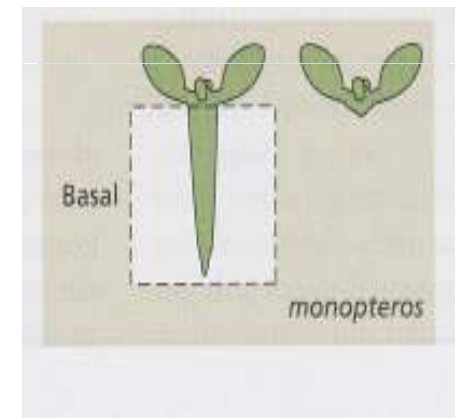
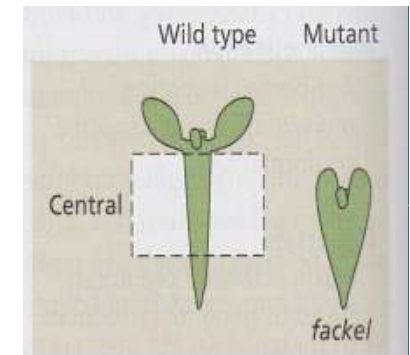
Hat BDL einen generellen Effekt auf die Apikal-Basal-Musterung in Pflanzen?

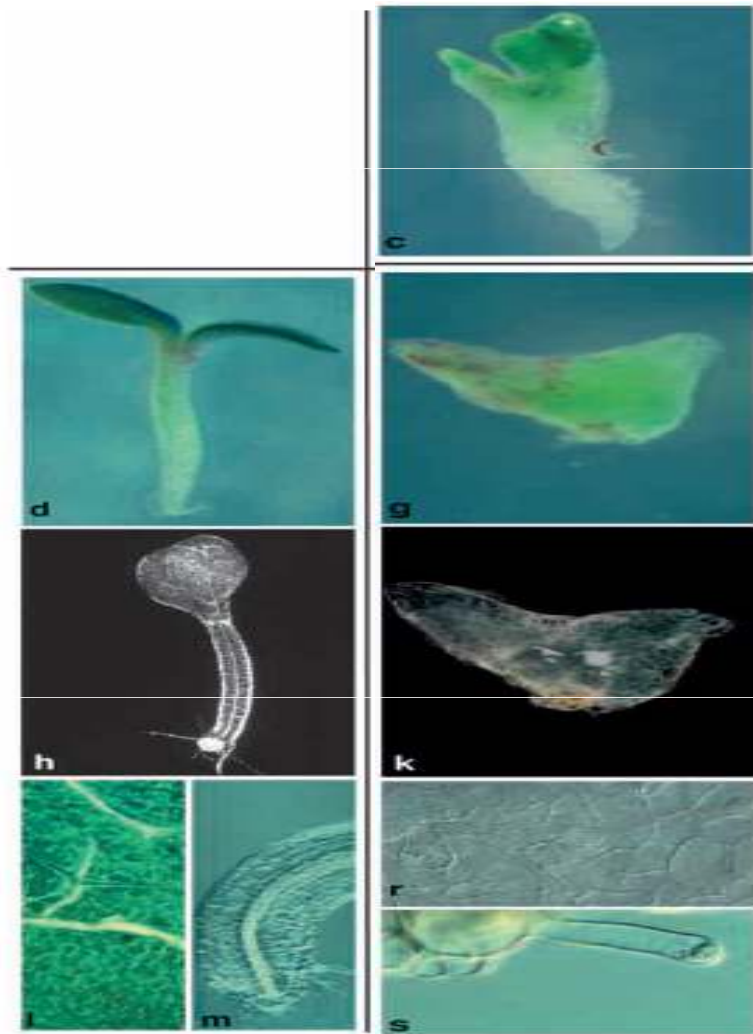
→ Analyse von Doppelmutanten

- Kreuzung von *bdI* mit anderen Mutanten:

fackel (fk) : Fehlen des Hypokotyls, Kotelydonen direkt mit Wurzeln verbunden, Kotelydonen missgebildet

monopteros (mp) : Kotelydonen teilweise verwachsen, Fehlen von Hypokotyl, Wurzel und Wurzelmeristem

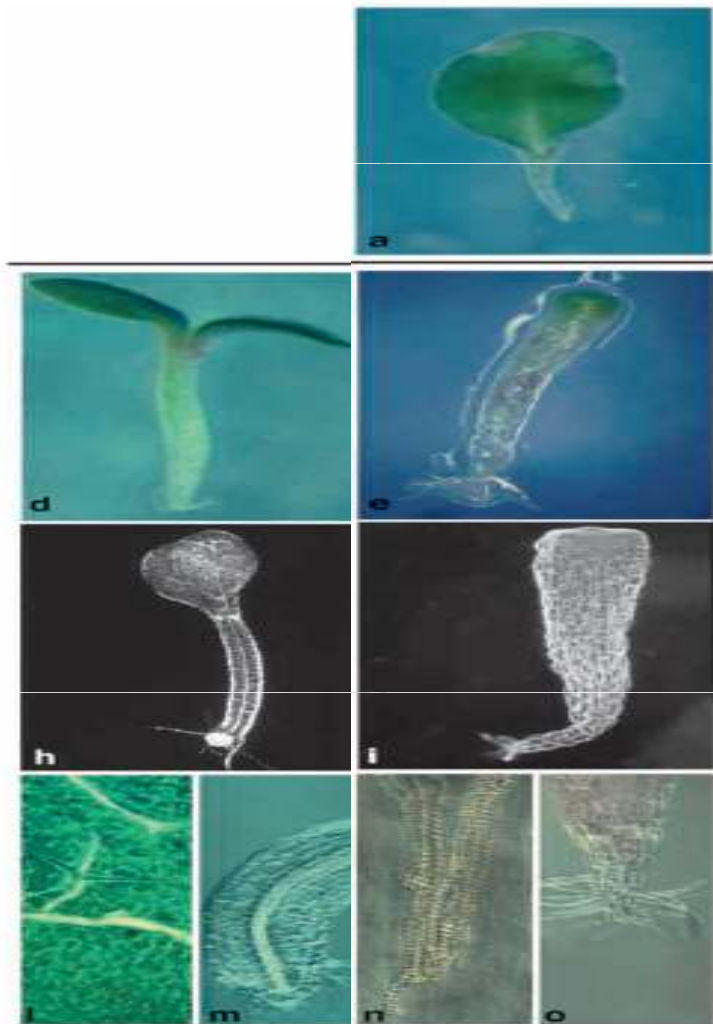


Doppelmutanten-Phänotyp

bdI fk:

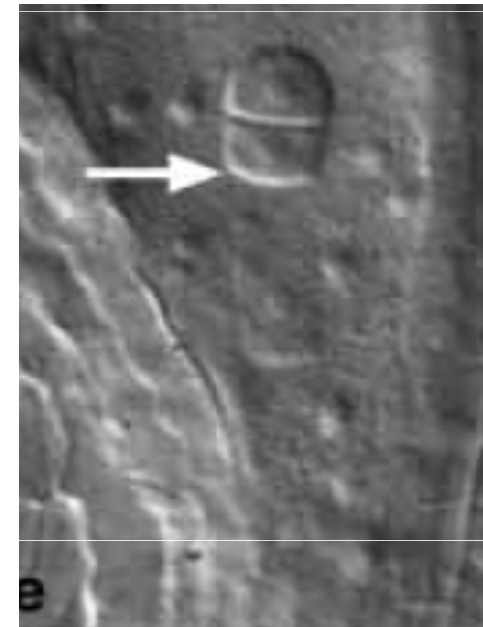
→ Additiver Effekt von *bdI* und *fk*

→ unterschiedlicher *Pathway*

Doppelmutanten-Phänotyp*bdI mp*:

- „neuartiger“ Phänotyp, der nicht auf additive Effekte zurückzuführen ist
 - Stark zurückgebildete Kotyledonen, Fehlen der Primärwurzel, verlängertes Hypokotyl
- synergetischer Effekt
 → *bdI* und *mp* vermutlich in selben *Pathway*

Wie erklärt sich der Phänotyp der Doppelmutante
bdI mp ?

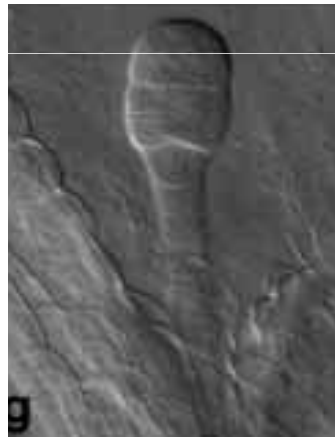
Analyse der Embryonalstadien:*bdI mp**WT**bdI/mp*

2 cell stage

Analyse der Embryonalstadien:



bdl mp



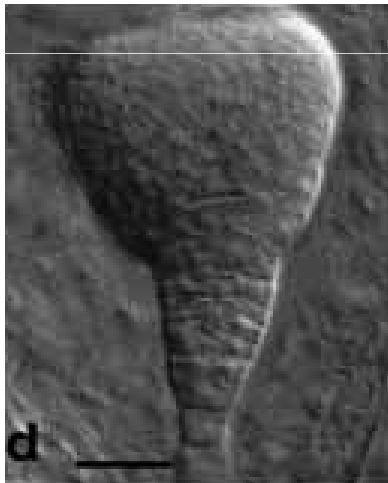
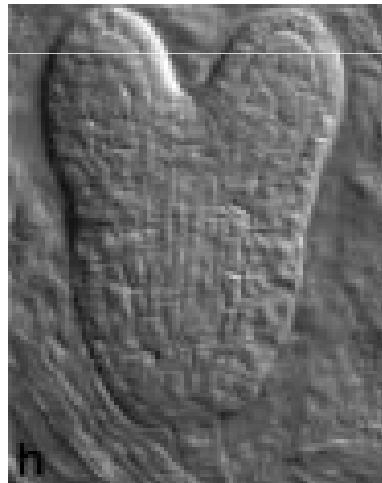
mp / bdl



8-Zellen-
Stadium



Globular-
Stadium

*bdI mp**mp / bdl**WT*Heart
stadium

→ Trotz ähnlichem Defekt im Zwei-Zell-Stadium, unterschiedliche Entwicklung zwischen Doppel- und Einfachmutanten

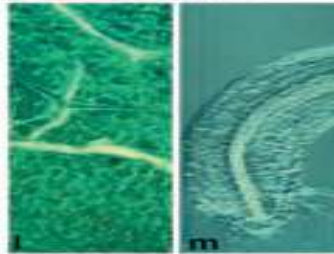
Doppelmutanten-Phänotyp

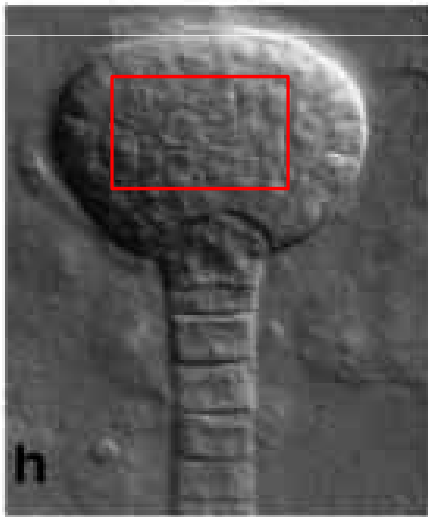
bdI axr1:



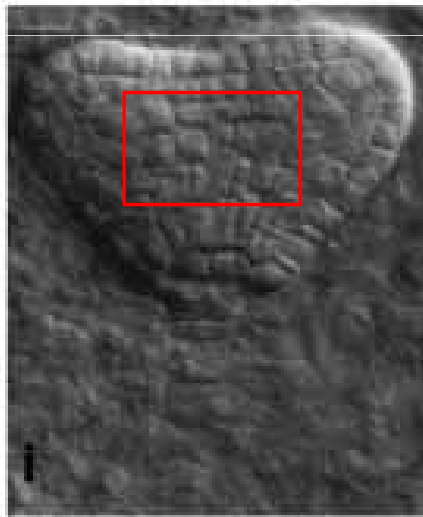
• ähnlicher Phänotyp wie *mp*

→ Auxin muss in Basal-Apikal-Musterung involviert sein



Embryogenese von *bdl axr1* :*bdl axr1*

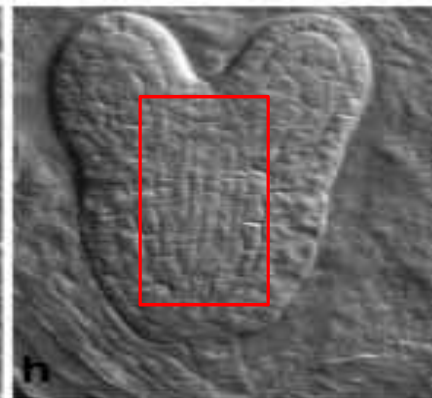
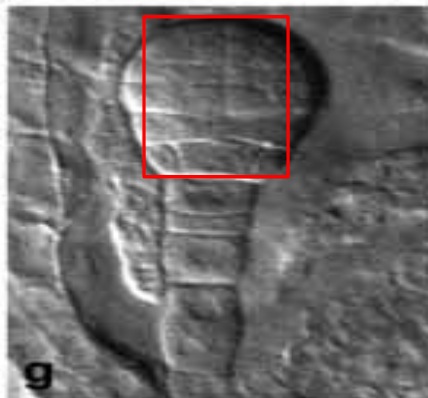
Globular



Heart

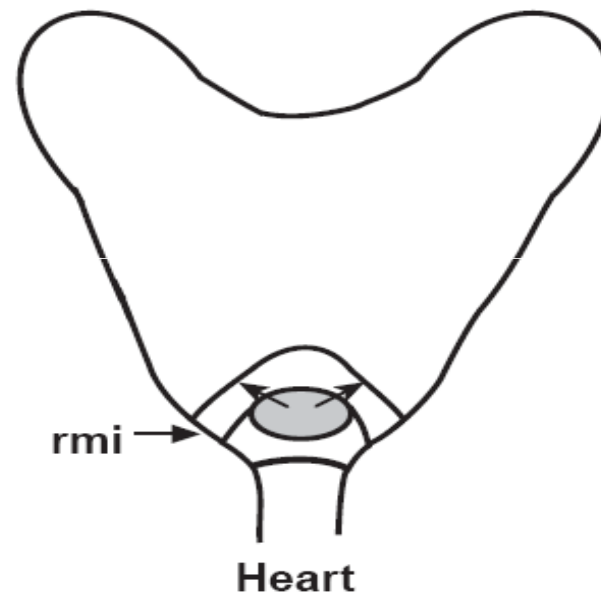
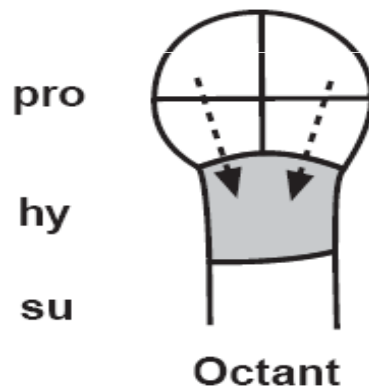


Torpedo

bdl

Diskussion/Zusammenfassung

- *bdI* Mutante stellt eine Verbindung zwischen Primärwurzelbildung und der auxinvermittelten Apikal-Basal-Musterung während der Embryogenese her
- *bdI* Pflanzen besitzen keine Primärwurzel (aber bilden Lateralwurzeln)
- Primärwurzelmeristem als Folge eines Signalaustausches zwischen der apicalen Tochterzelle der Zygote (=Proembryo) und dem oberen Teil der basalen Tochterzelle



- Modell wird durch Phänotyp von *hobbit* (*hbt*) und *monopteros* (*mp*), bzw. *bodenlos* (*bdl*) Mutanten gestützt
 - *hbt* : falsche Teilung von Vorläuferzelle der Hypophyse führt zum Fehlen des Basalen Teil des Embryos, wodurch kein Wurzelmeristem gebildet werden kann
 - *mp* : falsche Teilung der apicalen Zelle führt zu einer vierstufigen Zellschicht im Proembryo (statt zweistufig) → Hypophyse teilt sich wie Suspensor
 - keine Bildung von Hypokotyl und Primärwurzelmeristem
- *bdl* Pflanzen sind wie *axr1* insensitiv gegenüber Auxin (2,4-D)
 - keine Kallusbildung, kein Apikalhaken
 - Auxin ist möglicherweise in Ausbildung der Apikal-Basal-Musterung involviert
- *bdl mp* Doppelmutante weist einen Phänotypen auf, der auf einen synergetischen Effekt zurückzuführen ist
 - BDL und MP interagieren möglicherweise im selben Pathway