

**Von der Knospe zur offenen Blüte –
Rolle von Jasmonaten und MYB21 in der
Blütenentwicklung von *Solanum lycopersicum***

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Ramona Schubert

geb. am 08.03.1988 in Greiz

Gutachterinnen:

1. Prof. Dr. Bettina Hause
2. Prof. Dr. Tina Romeis
3. Prof. Dr. Margret Sauter

Verteidigungsdatum: 02.12.2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	iv
Tabellenverzeichnis.....	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Blütenentwicklung.....	1
1.1.1 Blütenarchitektur und Stadien	1
1.1.2 Entwicklung der Staubblätter mit Pollen	2
1.1.3 Entwicklung der Samenanlagen bis zur Initiierung der Fruchtbildung.....	2
1.2 Jasmonate	4
1.2.1 Funktion und Biosynthese.....	4
1.2.2 JA-Signalperzeption und JAZ-Proteine	5
1.2.3 JA-Mutanten	8
1.2.4 Rolle der Jasmonate in der Blütenentwicklung.....	8
1.3 MYB-Transkriptionsfaktoren.....	10
1.4 Weitere wichtige Phytohormone in der Blütenentwicklung	11
1.4.1 Auxin-Signalwirkung	11
1.4.2 Biosynthese der GAs	11
1.4.3 Auxine und GAs in der Blüten- und Fruchtentwicklung.....	13
1.4.4 Kultivar MicroTom zur Untersuchung hormonregulierter Prozesse.....	14
1.5 Zielstellung	15
2 Ergebnisse	17
2.1 Jasmonat-Funktion im Staubblatt – <i>cross-talk</i> mit ET.....	17
2.1.1 Pollenvitalität	17
2.1.2 Stomiumriss im Blütenstadium 4.....	18
2.1.3 Wassergehalt in der offenen Blüte	19
2.1.4 Genexpression ausgewählter JA- und ET-assoziiierter Gene	20
2.2 Jasmonat-Funktionen im Fruchtblatt – MYB14 und MYB21	23
2.2.1 Subzelluläre Lokalisation von MYB14 und MYB21.....	23
2.2.2 Transkriptionelle Aktivität von MYB21	24
2.2.3 Putative Interaktion von MYB21 mit JAZ-Proteinen.....	25
2.2.3.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System	25
2.2.3.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	25
2.2.3.3 Interaktionstest mittels <i>splitTALE</i>	26
2.2.4 Funktionelle Charakterisierungen von MYB14 und MYB21	29
2.2.4.1 Optimierung der stabilen Tomatentransformation.....	29
2.2.4.2 Überexpression von <i>MYB21</i> und <i>MYB14</i> im <i>jai1-1</i> -Hintergrund.....	30

2.2.4.2.1 Überexpression mit den kodierenden Sequenzen von <i>MYB14</i> und <i>MYB21</i>	30
2.2.4.2.2 Überexpression der genomischen Sequenz von <i>MYB14</i> und <i>MYB21</i> unter Kontrolle des <i>35S</i> -Promoters.....	31
2.2.4.2.3 Überexpression der genomischen Sequenz von <i>MYB14</i> und <i>MYB21</i> unter Kontrolle des <i>Cel1</i> -Promoters.....	34
2.2.4.3 Komplementation der <i>A. thaliana myb21-5</i> mit <i>SIMYB21</i>	38
2.2.4.4 <i>Loss-of-Function</i> -Linien von <i>MYB14</i> und <i>MYB21</i> im Wildtyp-Hintergrund	41
2.2.4.4.1 Charakterisierungen von <i>MYB14</i> -TILLING-Linien	41
2.2.4.4.2 Charakterisierungen von <i>MYB21</i> -TILLING-Linien	42
2.2.4.4.3 Herstellung und Charakterisierung von <i>MYB14</i> -Mutanten mittels CRISPR/Cas9.....	45
2.2.4.4.4 Herstellung und Charakterisierung von <i>MYB21</i> -Mutanten mittels CRISPR/Cas9.....	47
2.2.4.5 Komplementation der <i>Slmyb21-2</i> mit <i>SIMYB21</i>	53
2.2.4.6 Differenzielle Genexpression im Fruchtblatt des Blütenstadiums 3	56
2.2.4.6.1 Herunterregulierte Gene.....	56
2.2.4.6.2 Hochregulierte Gene	59
2.2.4.7 Gehalte an GAs im Fruchtblatt des Blütenstadiums 3	62
3 Diskussion	65
3.1 <i>MYB14</i> – Frage nach einer Funktion in der Fruchtblattentwicklung bleibt offen ...	65
3.2 Charakterisierung von <i>MYB21</i>	66
3.2.1 Analogien zwischen <i>MYB21</i> aus <i>A. thaliana</i> und <i>S. lycopersicum</i>	66
3.2.2 Komplexe Regulierung der Expression von <i>MYB21</i>	69
3.2.3 Funktionen von <i>MYB21</i>	71
3.2.3.1 Regulierung phänotypischer Blütenmerkmale durch <i>MYB21</i>	71
3.2.3.2 Regulierung der Genexpression durch <i>MYB21</i>	72
3.2.3.3 Einfluss von <i>MYB21</i> auf die Auxinsignalwirkung	74
3.2.3.4 Einfluss von JA und <i>MYB21</i> auf die GA-Signalwirkung	76
3.2.3.5 Model zur Funktion von <i>MYB21</i> in der Blütenentwicklung von Tomate	77
4 Zusammenfassung.....	79
5 Material und Methoden	81
5.1 Pflanzenanzucht und Ernte.....	81
5.2 Molekularbiologische Arbeiten	81
5.2.1 Genotypisierung der Tomaten-Mutanten <i>Nr</i> , <i>jai1-1</i> und <i>myb21</i>	81
5.2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	84
5.2.3 qPCR-Analysen	84

5.2.4 Analyse der Genexpression mittels FLUIDIGM	85
5.2.5 Transkriptomanalyse durch RNA-Sequenzierung	86
5.2.6 PCR mittels <i>High-Fidelity</i> Polymerasen.....	86
5.2.7 Klonierung mittels <i>Golden-Gate</i> -Methode	87
5.2.7.1 Klonierung benötigter Module	87
5.2.7.1 Restriktion und Ligation	88
5.2.8 Klonierung mittels <i>Gateway</i> -Methode	89
5.2.9 Transformation von <i>Escherichia coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	90
5.2.10 Plasmid-Isolation und Überprüfung	90
5.2.11 Subzelluläre Lokalisation in <i>N. benthamiana</i>	91
5.2.12 <i>SplitTALE</i> -Versuche in <i>N. benthamiana</i>	91
5.2.13 Transformation von <i>N. benthamiana</i> -Protoplasten	92
5.2.13.1 Isolierung der Plasmid-DNA	92
5.2.13.2 Protoplasten-Isolation.....	92
5.2.13.3 Transformation der Protoplasten und Analyse	93
5.2.14 Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien.....	93
5.2.14.1 Herstellung kompetenter Hefezellen	93
5.2.14.2 Transformation der kompetenten Hefe nach Gietz und Schiestl (2007).....	93
5.2.14.3 Interaktionstest	94
5.3 Biochemische Methoden.....	94
5.3.1 Western-Blot-Analyse	94
5.3.2 GUS-Färbung von Tomatenblüten	94
5.3.3 Pollenvitalitätstest	95
5.3.4 Semidünnschnitte von Samenanlagen.....	95
5.3.5 Quantifizierung von OPDA, JA, JA-Ile und GAs	95
5.4 Pflanzenphysiologische Arbeiten	96
5.4.1 Bestimmung des Wassergehaltes von Staubblättern	96
5.4.2 Pollenschlauchwachstum <i>in vitro</i>	96
5.4.3 Stabile Tomatentransformation	97
5.4.4 Generierung und Identifizierung transgener <i>A. thaliana</i> -Pflanzen.....	98
6 Literaturverzeichnis	99
7 Anhang.....	119
Danksagung.....	131
Lebenslauf	133
Eidesstattliche Erklärung.....	135

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau einer Tomatenblüte	1
Abb. 2: Blütenstadien 1 - 6 in MicroTom	1
Abb. 3: Schematischer Aufbau der Samenanlage	3
Abb. 4: Schema zur JA-Biosynthese	4
Abb. 5: Strukturformeln von Coronatin und (+)-7- <i>iso</i> -JA-Ile	5
Abb. 6: JA-Signalperzeption	6
Abb. 7: Modell von JAZ1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Abb. 8: Schematische Darstellung eines R2R3-MYB-Transkriptionsfaktors	10
Abb. 9: GA-Biosyntheseweg	13
Abb. 10: Lebensrate von Pollen der geöffneten Blüten	18
Abb. 11: Toluidin-blau gefärbte Semidünnschnitte der Stomiumregion von Antheren	19
Abb. 12: Wassergehalt der Staubblätter der geöffneten Blüte	20
Abb. 13: Heatmap mit spaltenweiser Mittelwert-Normierung der relativen Expressionswerte ausgewählter Gene in Staubblättern	21
Abb. 14: Lokalisation von MYB21 und MYB14	24
Abb. 15: Hefe-Assay zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität von MYB21	24
Abb. 16: Hefe-Zwei-Hybrid-System zur Detektion der putativen Interaktion von MYB21 mit zwölf JAZ-Proteinen	25
Abb. 17: BiFC-Studien in <i>N. benthamiana</i> -Protoplasten	26
Abb. 18: MYB21-JAZ9-Interaktion in <i>N. benthamiana</i> -Blättern	28
Abb. 19: Stabile Tomatentransformation	29
Abb. 20: <i>MYB14</i> -Expression in transgenen <i>jai1-1</i> -Linien	30
Abb. 21: <i>MYB21</i> -Expression in transgenen <i>jai1-1</i> -Linien	31
Abb. 22: Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> mit <i>MYB14</i> und <i>MYB21</i>	32
Abb. 23: <i>MYB14</i> -Expression in <i>jai1-1</i> heterozygoten Primärtransformanten	33
Abb. 24: 35S-Promoteraktivität im Blütenstadium 1 bis 5	33
Abb. 25: <i>Cel1</i> -Promoteraktivität im Blütenstadium 4	34
Abb. 26: <i>MYB14</i> -Expression in <i>jai1-1</i> heterozygoten Primärtransformanten	35
Abb. 27: <i>MYB21</i> -Expression in <i>jai1-1</i> heterozygoten Primärtransformanten	35
Abb. 28: Expression von endogenem und transgen eingebrachtem <i>MYB14</i> bzw. <i>MYB21</i> in <i>jai1-1</i> -Linien	37
Abb. 29: Komplementationsversuche von <i>Atmyb21-5</i> mit <i>MYB21</i>	38
Abb. 30: Blütenphänotyp von Wildtyp, <i>Atmyb21-5</i> und transgenen <i>Atmyb21-5</i> (<i>AtMYB21pro::gAtMYB21</i>)	39
Abb. 31: Blütenphänotyp von transgenen <i>myb21-5</i> (<i>AtMYB21pro::gSIMYB21:Flag</i>)	40
Abb. 32: Ausschnitt eines Aminosäurealignments von SIMYB14	41

Abb. 33: Ausschnitt eines Aminosäurealignments von SIMYB21	42
Abb. 34: Blüten und Früchte von <i>myb21-1</i> im Vergleich zum Wildtyp	43
Abb. 35: Toluidin-blau gefärbte Semidünnschnitte von Samenanlagen	44
Abb. 36: <i>MYB21</i> -Expression in Wildtyp im TILLING-Hintergrund und <i>myb21-1</i>	44
Abb. 37: Gehalte an OPDA, JA und JA-Ile in Frucht- und Staubblättern Stadium 3	45
Abb. 38: Schematische Darstellung von <i>MYB14</i> und CRISPR/Cas9-Klonierungsvektor	46
Abb. 39: Sequenzierung des ersten <i>MYB14</i> -Exons der CRISPR/Cas9-Linien.....	46
Abb. 40: <i>MYB14</i> -Expression in CRISPR/Cas9-Primärtransformanten	47
Abb. 41: Schematische Darstellung von <i>MYB21</i> und CRISPR/Cas9-Klonierungsvektor	47
Abb. 42: Sequenzierung des zweiten <i>MYB21</i> -Exons aus gDNA des Wildtyps, <i>myb21-2</i> und <i>myb21-3</i>	48
Abb. 43: Defekte in der Blütenöffnung und Samenbildung in <i>myb21-2</i> und <i>myb21-3</i>	49
Abb. 44: Pollenvitalität und Pollenkeimung in <i>myb21-2</i>	50
Abb. 45: Toluidin-blau gefärbte Semidünnschnitte von Samenanlagen	51
Abb. 46: Gehalte an OPDA, JA und JA-Ile in Frucht- und Staubblättern Stadium 3	52
Abb. 47: <i>SIMYB21</i> -Promoteraktivität im Blütenstadium 4	53
Abb. 48: Defekte in der Blütenöffnung und samenlose Früchte im in der F ₂ von transgenen <i>myb21-2</i> -Linien	54
Abb. 49: Defekte in der Blütenöffnung und samenlose Früchte in transgenen <i>myb21-2</i> - Linien.....	54
Abb. 50: Expression von endogenem und transgen eingebrachtem <i>MYB21</i> in transgenen <i>myb21-2</i> -Linien.....	55
Abb. 51: Venn-Diagramm	56
Abb. 52: Validierung für eine Auswahl an in <i>jai1-1</i> und <i>myb21-2</i> herunterregulierten Genen	57
Abb. 53: Wildtyp-Expression von in <i>jai1-1</i> und <i>myb21-2</i> herunterregulierter Gene	58
Abb. 54: Heatmap „Auxin-aktivierter Signalweg“	60
Abb. 55: Expression von <i>ARF9A</i> und <i>ARF4</i> im Wildtyp	60
Abb. 56: Heatmap „Gibberellinsäure-vermittelter Signalweg“	61
Abb. 57: Validierung für eine Auswahl an in <i>jai1-1</i> und <i>myb21-2</i> hochregulierten Genen	61
Abb. 58: Gehalte an GA in Fruchtblättern des Blütenstadiums 3	62
Abb. 59: Hypothetisches Model zur Funktion von <i>MYB21</i> in der Blütenentwicklung von Tomate	78
Anhang Abb. 1: Knospenlänge und Fruchtblatt-Gewicht von <i>myb21-2</i> im Stadium 3 ..	119
Anhang Abb. 2: <i>Enrichment Map</i> laut GO-Analyse von <i>jai1-1</i> und <i>myb21-2</i> vs. Wildtyp im Fruchtblatt des Blütenstadiums 3	CD

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der für die Auswertung der Fluidigm-qPCR genutzten Gene	22
Tab. 2: Zusammensetzung der Medien für die stabile Tomatentransformation	97
Anhang Tab. 1: Validierung der RNASeq-Daten für eine Auswahl an in <i>jai1-1</i> und <i>myb21-2</i> im Vergleich zum Wildtyp herunterregulierten Genen	119
Anhang Tab. 2: Validierung der RNASeq-Daten für eine Auswahl an in <i>jai1-1</i> und <i>myb21-2</i> im Vergleich zum Wildtyp hochregulierten Genen	120
Anhang Tab. 3: GA-Gehalte im Fruchtblatt des Blütenstadiums 3	121
Anhang Tab. 4: Primersequenzen zur Genotypisierung	121
Anhang Tab. 5: Primersequenzen für qPCR-Analysen	122
Anhang Tab. 6: Primersequenzen für <i>Golden-Gate</i> -Klonierungen	126
Anhang Tab. 7: Primersequenzen für <i>Gateway</i> -Klonierungen	127
Anhang Tab. 8: Primersequenzen für die Generierung und Identifikation transgener <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	129
Anhang Tab. 9: Expression ausgewählter Gene in Staubblättern der Stadien 3 bis 6 ..	CD
Anhang Tab. 10: Liste der differentiell exprimierten Gene laut RNA-Seq im Fruchtblatt des Blütenstadiums 3	CD

Abkürzungsverzeichnis

ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
ACX1A	Acyl-CoA-Oxidase 1A
AOS	Allenoxid-Synthase
AOC	Allenoxid-Zyklase
ARF	<i>Auxin-Response-Factor</i>
Aux/IAA	<i>Auxin/Indole Acetic Acid</i>
bHLH	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i>
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
COI1	<i>Coronatine-Insensitive 1</i>
CPS	<i>ent-Copalylidiphosphat-Synthase</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i>
<i>dad1</i>	<i>defective in anther dehiscence 1</i>
EAR	<i>Ethylene Responsive Factor-associated amphiphilic repression</i>
eFP	<i>Electronic Fluorescent Pictographic</i>
ET	Ethylen
<i>fad</i>	<i>fatty acid desaturation</i>
FDA	Fluoresceindiacetat
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FPKM	<i>Fragments Per Kilobase Million</i>
g	genomische Sequenz
GA(s)	Gibberellin(e)
GO	Gen-Ontologie
GUS	β -Glucuronidase
IAA	Indol-3-essigsäure
JA	(+)-7- <i>iso</i> -Jasmonsäure
JAs	Jasmonate
JA-Ile	(+)-7- <i>iso</i> -Jasmonsäure-Isoleucin
<i>jai1-1</i>	<i>jasmonate-insensitive 1-1</i>
JAZ	Jasmonat-ZIM-Domäne
KAO	<i>ent</i> -Kaurensäure-Oxidase
KAT	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase
KO	<i>ent</i> -Kauren-Oxidase
KS	<i>ent</i> -Kauren-Synthase

LFC	<i>Log2 Fold Change</i>
LOX	Lipoxygenase
MeJA	Methyljasmonat
MFP	multifunktionale Proteine
NINJA	<i>Novel Interactor of JAZ</i>
<i>Nr</i>	<i>Never ripe</i>
OPDA	<i>cis-(+)-Oxophytodiensäure</i>
OPR3	OPDA-Reduktase 3
PI	Proteinase-Inhibitor
PIN	<i>PIN-formed</i>
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
R	<i>Repeats</i>
SAUR	<i>Small Auxin Up regulated RNA</i>
SCF	Skp1/Cullin/F-Box
sek. ESK	sekundärer Embryosackkern
SRDX	<i>Superman-Repressive-Domain X</i>
SD	<i>Yeast-Synthetic-Drop-out</i>
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
TALE	<i>Transcription Activator-like Effectors</i>
TIR	<i>Transport Inhibitor Response</i>
TF(s)	Transkriptionsfaktor(en)
35S	<i>Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter</i>

1 Einleitung

Die Vollendung des Lebenszyklus' der Pflanzen liegt in der Samenbildung. In den Angiospermen erfordert dies eine präzise zeitliche Koordination der Entwicklung der Blütenorgane, der Befruchtung und Initiierung der Samen- und Fruchtbildung. Diese Prozesse sind durch Phytohormone reguliert.

1.1 Blütenentwicklung

1.1.1 Blütenarchitektur und Stadien

Die Blüte bildet die Fortpflanzungseinheit der Angiospermen. Die Tomate besitzt zwittrige Blüten als Euanthium, wobei *Solanum lycopersicum* vorwiegend selbstbestäubend ist. Die äußere Hülle der Blüte bildet das Perianth mit i.d.R. jeweils fünf Kelch- und Kronblättern. Im Inneren befinden sich die männlichen reproduktiven Strukturen aus fünf Staubblättern, jeweils bestehend aus Filament, Konnektiv und Staubbeutel (Anthere), die in Tomate zu einer geschlossenen Krone verwachsen sind. In Blüten des Kultivars MicroTom umschließen sie das coenokarpe Gynoeceum. Als weibliche reproduktive Einheit besteht dieses i.d.R. aus drei verwachsenen Fruchtblättern (Karpellen), die jeweils aus dem Ovar mit den Samenanlagen und dem Griffel mit der Narbe, dem Ort der Pollenaufnahme aufgebaut sind (Abb. 1). Das Gynoeceum ist von außen in einer intakten Blüte nicht sichtbar.

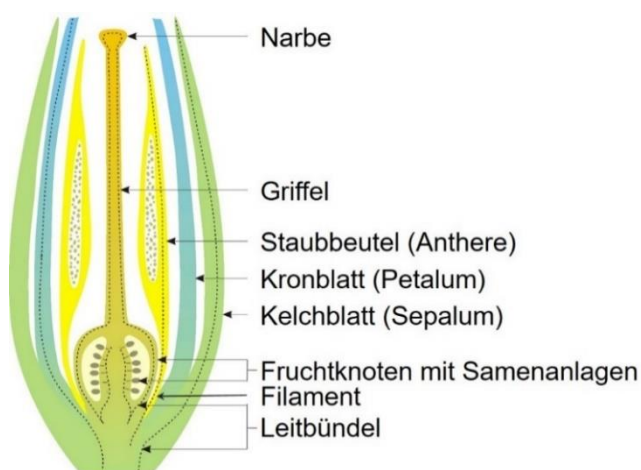


Abb. 1: **Schematischer Aufbau einer Tomatenblüte** (Katharine Esau, „Pflanzenanatomie“ 1969)



Abb. 2: **Blütenstadien 1 - 6 in MicroTom** (Dobritzsch et al., 2015)

Ein entscheidender Vorteil der Sorte MicroTom ist eine regelmäßige Blütenentwicklung, die anhand phänotypischer Merkmale zu gut charakterisierbaren Blütenstadien führt (Doktorarbeit Susanne Dobritzsch). Für gewöhnlich sind an einer Infloreszenz alle hier

definierten Blütenstadien gleichzeitig zu finden: Stadium 1 beschreibt eine kleine Knospe mit noch geschlossenen Kelchblättern, die sich im Stadium 2 bereits leicht öffnen. Stadium 3 kennzeichnet die dickste Knospe mit deutlich geöffneten Kelchblättern. Im Stadium 4 sind die Kronblätter bereits gelblich gefärbt und öffnen sich schließlich im Stadium 5. Das Stadium 6 beschreibt die geöffnete Blüte mit stark nach hinten gestreckten Kronblättern (Abb. 2).

1.1.2 Entwicklung der Staubblätter mit Pollen

Die Entwicklung der Staubblätter wird in zwei Phasen eingeteilt. In der frühen Entwicklungsphase kommt es zur Entstehung der Primordien (undifferenzierte Zellhaufen), der Gewebsdifferenzierung, der Morphogenese und der Mikrosporogenese. Die späte Phase ist durch die Ausdifferenzierung der Pollen und dem Antherenwachstum bis zum Eintritt der Seneszenz und der Pollenfreisetzung gekennzeichnet. Jede Anthere besitzt zwei sogenannte Theken mit jeweils zwei mit Lokularflüssigkeit gefüllten Pollensäcken, die von Tapetum, Mittelschicht, Endothecium und Epidermis umgeben sind (Wilson et al., 2011). Die Pollenentwicklung beginnt mit einer diploiden Sporenmutterzelle, aus der sich nach den zwei Teilungen innerhalb der Meiose vier haploide Mikrosporen bilden (Mikrosporogenese). Während der anschließenden Mikrogametogenese vergrößert sich die Mikrospore mit der Bildung einer einzelnen großen Vakuole (Pacini et al., 2011). Die anschließende erste Mitose führt zur Bildung einer großen vegetativen Zelle, die eine kleine generative Zelle enthält. Das, die Pollen ernährende Tapetum beginnt sich abzubauen und die Ernährung der Pollen erfolgt hauptsächlich durch die Lokularflüssigkeit. Durch eine zweite Mitose entsteht schließlich reifer, trizellulärer Pollen mit zwei Samenzellen. Die Antherenseneszenz beginnt mit der Verdickung des Endotheciums, wobei bei gleichzeitigem Pollenwachstum ein enormer Druck nach außen entsteht. Hinzu kommt die Auflösung des Septums und die Dehydrierung der Antherenwand, wodurch die Epidermiszellen schrumpfen, was schließlich zum Riss des Stomiums führt, der Stelle des Pollenfreigabe (Wilson et al., 2011). Die Pollen dehydrieren kurz zuvor um vor schädlichen Umwelteinflüssen geschützt zu sein, und rehydrieren i.d.R. erst wieder auf einem kompatiblen Stigma (Pacini et al., 1999).

1.1.3 Entwicklung der Samenanlagen bis zur Initiierung der Fruchtbildung

Die Samenbildung in Pflanzen geht von den Samenanlagen aus, die geschützt im Fruchtknoten liegen. Sie bestehen aus drei weitgehend konservierten Strukturen: dem Nucellus, der den weiblichen Gametophyt (Embryosack) umschließt; die Chalaza, die die

Bildung der Integumente initiiert und dem Funiculus, der die Samenanlagen mit der Plazenta und damit mit der Nährstoffzufuhr verbindet (Schneitz et al., 1995). Die Tomate besitzt anatrophe und tenuinucellate Samenanlagen. Letzteres bedeutet, dass keine hypodermale Zellschicht zwischen der Embryosackmutterzelle und der Nucellus-Spitze ausgebildet wird und somit ein „dünnere“ Nucellus vorliegt (Endress et al., 2011). Die Entwicklung des Embryosacks beginnt nach der Meiose, wenn sich eine der vier haploiden Tochterzellen in eine funktionale Megaspore entwickelt. Diese durchläuft drei mitotische Kernteilungen, gefolgt von einer Zellularisierung, die sieben Zellen entstehen lässt. Diese gehören zu vier unterschiedlichen Zelltypen, wobei jeder eine definierte Position und Funktionen innehat: die Zentralzelle mit anfangs zwei haploiden Zellkernen, die zum sekundären Embryosackkern verschmelzen, die Eizelle sowie zwei Synergiden und drei Antipoden an jeweils einem Pol des Embryosacks (Sprunck und Groß-Hardt, 2011; Drews und Koltunow, 2011; Abb. 3). In den meisten Angiospermen kommt es zur doppelten Befruchtung innerhalb der Samenanlage. Das heißt, eine Samenzelle fusioniert mit der haploiden Eizelle zur Bildung eines diploiden Embryos und die zweite Samenzelle fusioniert mit der diploiden Zentralzelle, was das triploide Endosperm entstehen lässt. Das maternale Gewebe der Samenanlage durchläuft dabei drastische Veränderungen. Die Differenzierung der Samenschale aus den Integumenten erfordert kontrollierte Zellteilungen und –streckungen, die hauptsächlich durch das Endosperm gesteuert werden (Haughn und Chaudhury et al., 2005).

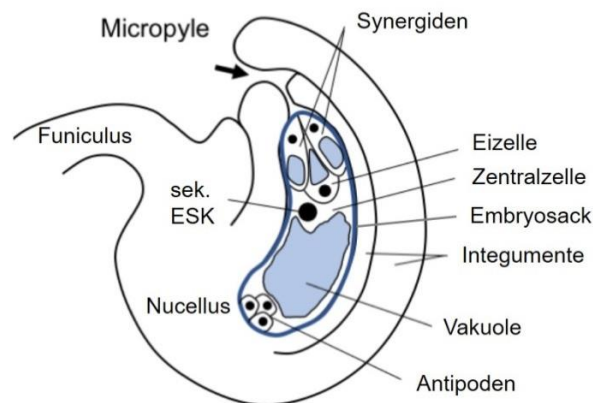


Abb. 3: **Schematischer Aufbau der Samenanlage**

Die Abbildung ist angepasst nach Skinner und Sundarean (2018). Im gezeigten Entwicklungszustand sind die haploiden Zellkerne der Zentralzelle bereits zum diploiden sekundären Embryosackkern (sek. ESK) verschmolzen.

1.2 Jasmonate

Eine wichtige Gruppe der Pflanzenhormone, die in die Regulierung der Blütenentwicklung und Ausbildung der Fertilität involviert ist, sind die Jasmonate (JAs).

1.2.1 Funktion und Biosynthese

JAs gehören zur Gruppe der Oxylipine und umfassen alle Vorstufen und Derivate der Jasmonsäure (JA) (Mosblech et al., 2009). Sie werden über den Octadecanoid-Weg synthetisiert (Wasternack und Hause, 2013; Wasternack und Strnad, 2018; Abb. 4). Initial wird 18:3 α -Linolensäure aus der Plastidenmembran mithilfe von Phospholipasen freigesetzt. Die 13-Lipoxygenase (13-LOX) katalysiert die Oxidation der α -Linolensäure. Durch die 13-Allenoxid-Synthase (13-AOS) und die Allenoxid-Zyklase (AOC) wird schließlich die *cis*-(+)-Oxophytodiensäure (OPDA) synthetisiert. Die genannten Enzyme sind in den Chloroplasten lokalisiert (Ziegler et al., 2000; Froehlich et al., 2001). Alle nachfolgenden Reaktionen finden im Peroxisom statt. Die *cis*-(+)-OPDA-spezifische OPDA-Reduktase 3 (OPR3) katalysiert die Umwandlung von OPDA zu der 3-Oxo-2-(2'(Z)-pentenyl)-cyclopentan-1-octanoidsäure (OPC-8:0). Daran schließen sich drei Zyklen der β -Oxidation an, an der die Acyl-CoA-Oxidase 1A (ACX1A), multifunktionale Proteine (MFP) und die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (KAT) beteiligt sind (Li et al., 2005). Durch die Kürzung der carboxylierten Kette entsteht (+)-7-*iso*-JA.

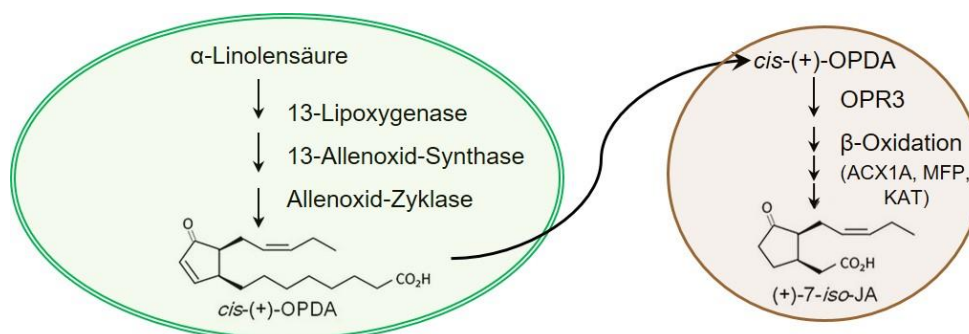


Abb. 4: **Schema zur JA-Biosynthese**

Die Reaktionen laufen in den Plastiden (grün umrandet) und Peroxisomen (braun umrandet) ab.

JA kann in verschiedener Weise konjugiert werden: durch eine Methylierung (Methyljasmonat, MeJA), eine Decarboxylierung (*cis*-Jasmon), die Verbindung mit einer Aminosäure oder durch eine Hydroxylierung (11-OH-JA, 12-OH-JA) (Wasternack und Hause, 2013). Das Aminosäurekonjugat (+)-7-*iso*-JA-Isoleucin (JA-Ile) bildet neben dem strukturellen Mimik Coronatin, ein von *Pseudomonas syringae* produziertem Phytotoxin, die Form mit der größten biologischen Aktivität (Fonseca et al., 2009; Sheard et al., 2010; Abb. 5). Aber auch für OPDA und dessen Isoleucin-Konjugat OPDA-Ile wurden biologische Funktionen beispielsweise während der Embryoentwicklung in Tomate und

der Wundantwort nachgewiesen (Fonseca et al., 2009; Ribot et al., 2008; Goetz et al., 2012; Arnold et al., 2016; Taki et al., 2005). Es hat sich allerdings herausgestellt, dass der Nachweis von JA-unabhängigen OPDA-Funktionen aufgrund des kürzlich identifizierten OPR3-unabhängigen JA-Biosynthesewegs nicht eindeutig ist (Chini et al., 2018).

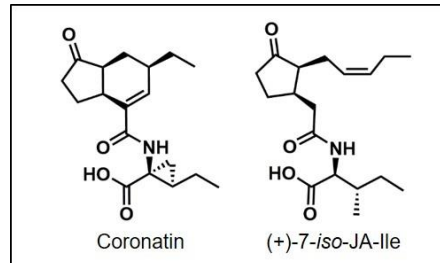


Abb. 5: **Strukturformeln von Coronatin und (+)-7-iso-JA-Ile**

JAs spielen eine herausragende Rolle in der Abwehr von nekrotrophen Pathogenen und Herbivoren sowie in der Reaktion auf Verwundung (Li et al., 2005; Koo und Howe, 2009; Wasternack et al., 2006; Goossens et al., 2016). Dabei kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der JA-Biosynthese und der damit verbundenen Signalwirkung mit der Expression JA-responsiver Gene, die beispielsweise für Proteinase-Inhibitoren (PIs) kodieren, die die Verdauung der Insekten hemmen (Sun et al., 2011). Zudem haben JAs Funktionen in pflanzlichen Entwicklungsprozessen inne. So sind sie u.a. am Wurzelwachstum sowie an der Entwicklung der Trichome und Blüten beteiligt (Stintzi und Browse, 2000; Li et al., 2005; Wasternack und Hause, 2013; Dobritsch et al., 2015).

1.2.2 JA-Signalperzeption und JAZ-Proteine

Die JA-Signalwirkung wird über den proteasomalen Abbau der *Jasmonat-ZIM-Domäne* (JAZ)-Repressorproteine vermittelt. Ihre Entdeckung brachte das fehlende Bindeglied zur Identifikation des Rezeptorkomplexes für JA-Ile (Thines et al., 2007; Yan et al., 2007). Ohne das Vorhandensein von JA-Ile binden die JAZ-Proteine an JA-regulierte Transkriptionsfaktoren (TFs) und hemmen damit deren Aktivität. Sobald der Gehalt an JA-Ile innerhalb der Zelle ansteigt, bindet JA-Ile an das F-Box-Protein *Coronatinsensitive1* (COI1) des Skp1/Cullin/F-Box (SCF)-Komplexes binden und ermöglicht damit die Rekrutierung der JAZ-Proteine an den Komplex (Yan et al., 2009; Yan et al., 2018). Dieser besitzt E3-Ligase-Aktivität, ubiquitiniert JAZ-Proteine und markiert diese damit für den Abbau durch das 26S-Proteasom. Somit werden die JA-regulierten TFs freigesetzt und die Transkription JA-regulierter Gene beginnt (Abb. 6). Zu diesen gehören auch Gene, die für Enzyme der JA-Biosynthese kodieren (wie LOX2 und AOS),

wodurch eine positiver Rückkopplungsmechanismus gewährleistet ist (Stintzi und Browse, 2000; Jensen et al., 2002; Laudert et al., 1998).

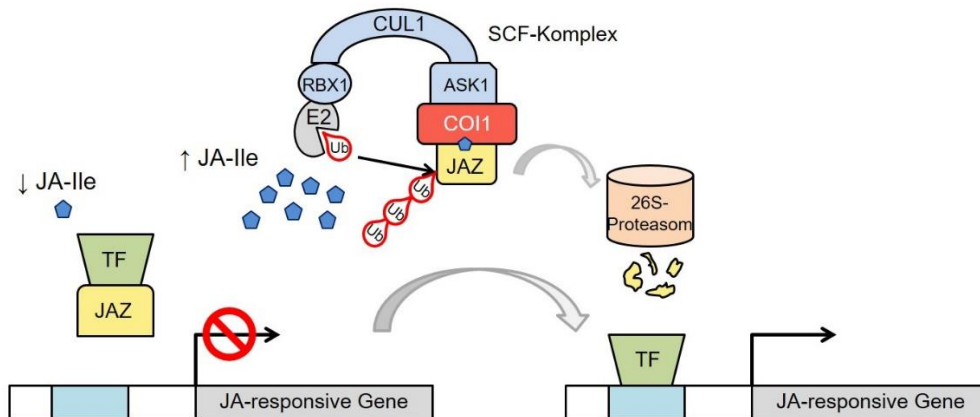


Abb. 6: **JA-Signalperzeption**, vereinfacht nach Wasternack und Hause (2013)

Die JAZ-Proteine als Repressoren der JA-regulierten TFs werden bei Vorhandensein von JA-Ile durch den SCF-Komplex ubiquitiniert (Ubiquitin, Ub). Nach dem Abbau der JAZ-Proteine können die besagten TFs die Expression der JA-responsiven Gene aktivieren.

JAZ-Proteine zeichnen sich sowohl durch eine TIFY- (auch ZIM genannt) als auch Jas-Domäne aus. Die Jas-Domäne ist durch die Aminosäureabfolge S-L-X(2)-F-X(2)-K-R-X(2)-R in der Mitte, einem konservierten *N*-terminalen Prolin und C-terminalen PY-Motiv sowie zwei zusätzlichen basischen Resten im *N*-Terminus definiert (Pauwels und Goossens et al., 2011; Abb. 7). Letztere sind besonders wichtig für die Bindung an COI1, wofür der *N*-terminale Teil der Jas-Domäne ausreicht, das JAZ-Degron (Melotto et al., 2008). Des Weiteren dient die Jas-Domäne als Bindestelle für die TFs (Song et al., 2011). Die TIFY-Domäne hingegen ermöglicht die Bildung von JAZ-Homo- oder Heteromeren und die Bindung von NINJA (*Novel Interactor of JAZ*), welches den Ko-Repressor TOPLESS rekrutiert (Chung und Howe et al., 2009; Pauwels et al., 2010). Die Interaktion mit NINJA wird durch das *ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR-associated amphiphilic repression* (EAR)-Motiv vermittelt (Pauwels et al., 2010).

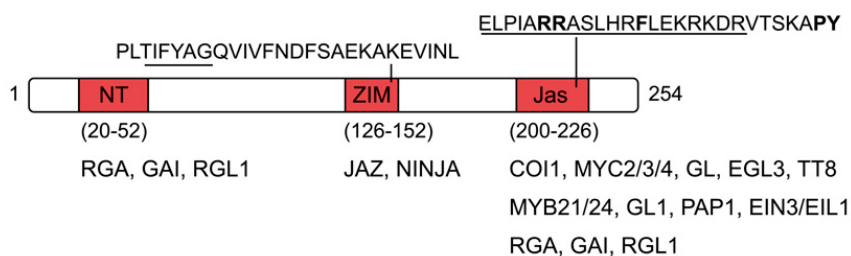


Abb. 7: **Modell von JAZ1 aus *Arabidopsis thaliana*** (Pauwels und Goossens, 2011)

Die Aminosäuresequenzen der ZIM- und Jas-Domäne sind angegeben und das TIFY-Motiv sowie das JAZ-Degron hervorgehoben (unterstrichen). Bekannte Interaktoren mit den einzelnen Domänen sind gelistet. Die Jas-Domäne bindet COI1, *basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH)-TFs (wie MYC2/3/4, GL, EGL3, TT8), MYB-TFs (wie MYB21/24, GL1, PAP1), Ethylen (ET)-responsive TFs (EIN3/EIL1) und DELLA-Proteine (RGA, GAI, RGL1).

In *A. thaliana* sind 13 JAZ-Proteine bekannt, in Tomate zwölf (Chini et al., 2017). JAZ-Proteine wirken redundant, was fehlende, veränderte Phänotypen in *jaz*-Einzelmutanten und milde konstitutive JA-Antworten in *jazQ* (mutiert in *AtJAZ1*, -3, -4, -9 und -10) bestätigen (Major et al., 2017). Dennoch vermitteln oder feinregulieren bestimmte JAZ-Proteine spezifische JA-Antworten (Yan et al., 2014; Wu et al., 2015; Gimenez-Ibanez et al., 2017; Li et al., 2017). Diese Spezifität wird durch eine zum Teil auftretende Interaktion mit bestimmten TFs vermittelt (Chini et al., 2016). Zusätzlich scheint auch die Bindungsaffinität an COI1 unterschiedlich stark zu sein. Beispielsweise unterscheidet sich die nötige Konzentration an Coronatin für die Interaktion mit COI1 zwischen *AtJAZ1* und *AtJAZ9* um ein Vielfaches (Melotto et al., 2008). Zudem gibt es strukturelle Unterschiede, die die Wirkungsweise verändern. So fehlen *JAZ7* und *JAZ8* aus *A. thaliana* und *JAZ9*, -10 und -11 aus Tomate die beiden für die COI1-Bindung essentiellen basischen Aminosäuren im *N*-Terminus der Jas-Domäne (Pauwels und Goossens, 2011; Chini et al., 2017), wodurch ihr Abbau möglicherweise durch Heteromerbildung vermittelt werden muss. Im Gegensatz dazu fehlt in *AtJAZ13* die TIFY-Domäne, wodurch keine Hetero- oder Homomerbildung möglich ist und eine direkte Interaktion (ohne NINJA) mit TOPLESS vorliegt (Thireault et al., 2015). Zudem enthalten vier JAZ-Proteine aus *A. thaliana* (*JAZ5* bis 8) und sechs aus Tomate (*JAZ3*, -4, -7, -9, -10 und -11) bereits ein oder zwei EAR-Motive, wodurch keine Interaktion mit NINJA stattfinden muss (Kagale et al., 2010; Pauwels et al., 2010; Chini et al., 2017). Die meisten *JAZ* prä-mRNA's unterliegen alternativem Spleißen, wodurch verkürzte Versionen ohne X₅PY-Motiv der Jas-Domäne entstehen. Auch wenn diese Aminosäuren außerhalb des JAZ-Degrans liegen, weisen diese Isoformen ein geringeres Bindepotenzial mit COI1 auf, was zumindest für *AtJAZ10* nachgewiesen wurde (Chung et al., 2010). Zusätzlich kann das PY-Motiv eine Rolle bei der subzellulären Lokalisation spielen (Grunewald et al., 2009). Damit verbunden erfolgt die Regulierung verschiedenartiger JA-Antworten aufgrund der gewebe- und entwicklungs-spezifischen Expression der JAZ-Gene (Winter et al., 2007; Thatcher et al., 2016). Dementsprechend ist auch die Akkumulation verschiedener JAs und ihre Modifikation in unterschiedlichen Geweben stress- oder entwicklungsabhängig (Hause et al., 2000; Miersch et al., 2008). Schließlich entsteht eine weitere Spezifität durch den *cross-talk* mit anderen Phytohormonen, insbesondere den Gibberellinen (GAs). Die Repressoren der GA-Signalvermittlung (DELLA-Proteine) sind direkte Interaktionspartner bestimmter JAZ-Proteine und können mit ihnen um die Bindung an TFs konkurrieren (Abb. 7; Hou et al., 2010; Wild et al., 2012).

1.2.3 JA-Mutanten

Vor allem in *A. thaliana* wurden diverse JA-Mutanten identifiziert. Dabei unterscheidet man zwischen JA-defizienten Mutanten, wie beispielsweise die *fad3 fad7 fad8* (*triple fad, fatty acid desaturation*)-Dreifachmutante, *dad1* (*defective in anther dehiscence1*), *aos* und *opr3* sowie JA-insensitiven Mutanten, die eine Mutation im COI1-Protein aufweisen (McConn und Browse, 1996; Ishiguro et al., 2001; Park et al., 2002; Stintzi und Browse, 2000; Feys et al., 1994). Sie dienen als molekulares Werkzeug um JA-Funktionen innerhalb der Pflanze zu untersuchen. Dabei können die JA-vermittelten, zum Wildtyp veränderten Phänotypen der JA-defizienten Mutanten durch JA-Behandlungen wieder rückgängig gemacht werden, während insensitive Mutanten eine Unterscheidung zwischen COI1-abhängigen und –unabhängigen Prozessen erlauben.

Die rezessive *jasmonate-insensitive1-1*-Mutante (*jai1-1*) in Tomate wurde bei einem Screen innerhalb einer *fast-neutron* mutagenisierten MicroTom Population selektiert: Die Individuen waren nicht in der Lage die Polyphenoloxidase sowie PI-II nach einer Behandlung mit MeJA anzureichern (Li et al., 2004). Bis auf eine reduzierte Trichomanzahl zeigen nicht gestresste Pflanzen keine offensichtlichen Unterschiede zum Wildtyp. Allerdings sind *jai1-1*-Pflanzen weiblich steril. Die Mutation besteht in einer 6,2 kb großen Deletion im *COI1*-Gen, welches den Ko-Rezeptor im JA-Signalweg kodiert. Damit begründet sich der Mutanten-Phänotyp mit dem Funktionsverlust des COI1-Proteins, wodurch JA-Ile nicht perzipiert werden und damit keine oder nur eine geringe Genexpression für JA-regulierte Prozesse auslösen kann. Nur eine basale Expression der frühen JA-induzierten Gene ist in *jai1-1* noch vorhanden, was auf eine zusätzliche COI1-unabhängige Kontrolle hindeutet (Li et al., 2004).

1.2.4 Rolle der Jasmonate in der Blütenentwicklung

Die Rolle der JAs in der Blütenentwicklung ist vor allem aus Beobachtungen in *A. thaliana* offensichtlich. So sind die bereits genannten JA-Biosynthesemutanten *triple fad*, *dad1*, *aos* und *opr3* sowie die JA-insensitive *coi1* männlich steril (McConn und Browse, 1996; Ishiguro et al., 2001; Park et al., 2002; Stintzi und Browse, 2000; Feys et al., 1994). Der veränderte Phänotyp umfasst dabei eine verspätete oder ganz ausbleibende Antherendehiszenz, die Bildung keimungsunfähiger Pollen und/ oder verkürzter Filamente. Ishiguro et al. (2001) postulieren dabei eine Schlüsselfunktion von JA-Ile, welches im oberen Teil der Filamente infolge der Expression von *DAD1* synthetisiert wird und dadurch den Wassertransport aus den Antherengeweben in die Filamente fördert. Die Dehydrierung der Antheren löst zumindest zum Teil deren Öffnung aus und die Wasseraufnahme der Filamente deren Verlängerung sowie auch die Elongation der

Kronblätter und die Blütenöffnung. In Transkriptomanalysen von Staubblättern der *opr3*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp wurden mehr als 800 JA-regulierte Gene identifiziert, wobei für zwei darunter befindlichen TFs, *MYB21* und *MYB24*, eine offensichtliche Funktion während der Staubblattentwicklung nachgewiesen wurde (Mandaokar und Browse, 2006).

Zentrale JA-Funktionen in der Ausbildung der männlichen Fertilität in *A. thaliana* wurden auch aus der männlichen Sterilität von MYC5-SRDX (*Superman Repressive Domain X*)-Pflanzen abgeleitet (Figueroa und Browse, 2015). Der bHLH-TF MYC5 und andere redundante MYC-Faktoren sind JA-reguliert und aktivieren wahrscheinlich die Expression von *AtMYB21*, *AtMYB24*, *AtMYB57* und *AtMYB108* (Figueroa und Browse, 2015). Die Regulierung durch JA und ihre Funktion in der Staubblattentwicklung wurde für MYB57 und MYB108 bereits zuvor nachgewiesen (Cheng et al., 2009; Mandaokar und Browse, 2009).

Auch wenn sich die JA-Funktionen in *A. thaliana* hauptsächlich auf die Entwicklung der männlichen Blütenorgane beziehen, so sind die konkreten Wirkungsarten und -orte von JA-Ile innerhalb der Blütenentwicklung artspezifisch. Beispielsweise spielt in Reis JA eine entscheidende Rolle in der Bestimmung der Organidentität und Anzahl der Ährchen. So zeigen Pflanzen mit einer Mutation im *EG1*-Gen (*extra glume1*), welches für eine plastidäre Phospholipase A₁ kodiert (vergleichbar mit *AtDAD1*), eine veränderte Ährchen-Morphologie (Cai et al., 2014). Außerdem wurde eine JA-Funktion in der Schwellung der Lodicalae und damit der gleichzeitigen Öffnung der Ährchen sowie vergleichbar zu *A. thaliana* in der Antherendehiszenz nachgewiesen (Liu et al., 2017; Xiao et al., 2014).

Im einhäusig getrenntgeschlechtlichen Mais wurde gezeigt, dass JA eine Rolle bei der Geschlechtsbestimmung der einzelnen Blüten spielt. Eine gestörte JA-Biosynthese führt zur Bildung weiblicher Organe in den männlichen Blütenständen (Acosta et al., 2009).

Die Tomatenmutante *jai1-1* ist im Gegensatz zur ebenfalls im COI1-Protein mutierten *A. thaliana*-Mutante *coi1* weiblich steril (Li et al., 2004). Auch wenn die Staubblätter ebenfalls Fehlentwicklungen, wie eine verfrühte Antherendehiszenz und Pollenausschüttung sowie eine reduzierte Anzahl vitaler Pollen zeigen, kommt es zur erfolgreichen Befruchtung des Wildtyps nach der Bestäubung mit *jai1-1*-Pollen (Li et al., 2004; Dobritzsch et al., 2015). Der determinierende Faktor liegt in der Entwicklung des Fruchtblattes mit den Samenanlagen. Dies geht einher mit weit höheren Gehalten von OPDA, JA und JA-Ile im Fruchtblatt als in Blättern (nicht gestresster Pflanzen) sowie der vorrangigen Lokalisation des wichtigen Biosynthese-Enzyms AOC in den Samenanlagen (Schubert et al., 2019; Hause et al., 2000). Vergleichende Transkriptomanalysen zwischen Wildtyp- und *jai1-1*-Samenanlagen zeigen eine Vielzahl differentiell regulierter

und somit JA- abhängiger Gene (Schubert et al., 2019). Unter den in *jai1-1* herunter regulierten Genen ist auch *MYB21*, der im Wildtyp insbesondere im Blütenstadium 3 sehr hohe Transkriptlevel aufweist.

1.3 MYB-Transkriptionsfaktoren

MYB-TFs bilden eine große, funktionell diverse Gruppe, die in allen Eukaryoten zu finden sind. Namensgebend war das erste, identifizierte MYB-Gen, das Onkogen *v-MYB* aus dem Avian **Myeloblastosis** Virus, welches von einem Gen der Vertebraten abstammt (Paz-Ares et al., 1987). Sie besitzen mindestens eine konservierte MYB-Domäne, die die Bindung an die DNA ermöglicht. MYB-Domänen bestehen aus bis zu vier unvollkommenen Sequenz-Wiederholungen (*repeats*, R) aus i.d.R. jeweils 52 Aminosäuren. Diese enthalten konservierte Tryptophane in regelmäßigen Abständen, die die Bildung einer Helix-Schleifen-Helix-Sekundärstruktur und damit die Interkalation in die große Furche der DNA ermöglichen (Ogata et al., 1996; Abb. 8). Abhängig von der Anzahl und Art der *repeats* wird zwischen verschiedenen Typen unterschieden: von 1R-MYB- mit nur einer bis zu 4R-MYB-TFs mit vier MYB-Domänen (Dubos et al., 2010). Die Gruppe der R2R3-MYB-Faktoren mit zwei unterschiedlichen MYB-*repeats* bildet in Pflanzen die Größte. So gehören in Tomate 122 der 127 MYB-Faktoren, einschließlich MYB21, in diese Gruppe (Li et al., 2016).

Die große Anzahl symbolisiert ihre diversen Funktionen in Stress- und Entwicklungsprozessen. Dabei fungieren sie sowohl als Transkriptionsaktivatoren als auch -Repressoren. So wurde in 24 MYB-Faktoren das EAR-Motiv nachgewiesen, welches das bis jetzt häufigste Motiv zur Hemmung der Transkription darstellt (Kagale und Rozwadowski, 2014; Li et al., 2016). Funktionelle Charakterisierungen der MYB-TFs bleiben weiterhin ein offenes Forschungsgebiet.

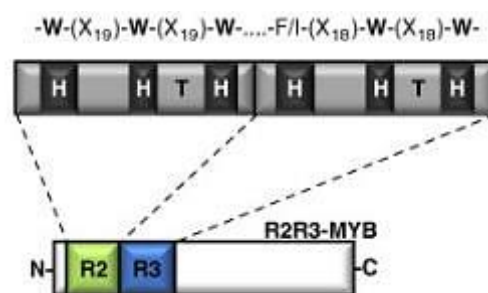


Abb. 8: **Schematische Darstellung eines R2R3-MYB-TFs** (Dubos et al., 2010)

Gezeigt sind die konservierten Tryptophane (W) in regelmäßigen Abständen in der Primärstruktur und die Helix-Schleifen-Helix-Sekundärstruktur (H-T-H) in den *repeats* R2 und R3.

1.4 Weitere wichtige Phytohormone in der Blütenentwicklung

Die Regulierung der Blüten- und Fruchtentwicklung durch Phytohormone ist überaus komplex. Neben JAs steuern vor allem Auxine und GAs sowie ihr *cross-talk* miteinander einen Großteil der ablaufenden Prozesse. Diese unterscheiden sich allerdings im Konkreten zwischen einzelnen Arten und sind nur in *A. thaliana* genauer erforscht.

1.4.1 Auxin-Signalwirkung

Auxine bilden eine Gruppe von Phytohormonen, die maßgeblich an Wachstums- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind, mit Indol-3-essigsäure (IAA) als wichtigster Form.

Für die Auxin-Signalwirkung spielen die TFs der Gruppe der *Auxin-Response-Factors* (ARFs) sowie die *Auxin/Indole Acetic Acid*-Proteine (Aux/IAAs) als deren Repressoren eine zentrale Rolle (Wu et al., 2011; Audran-Delalande et al., 2012). Die Hemmung der transkriptionellen Aktivität der ARFs erfolgt durch die Rekrutierung von Ko-Repressoren der TOPLESS-Familie durch die Aux/IAAs (Szemenyei et al., 2008). Vergleichbar mit der JA-Signalperzeption erfolgt bei Vorhandensein von Auxin der proteasomale Abbau der Aux/IAAs vermittelt durch einen SCF-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex (Chapman und Estelle, 2009). Dabei ist *Transport-Inhibitor-Response* (TIR1) oder seine AFB-Homologen das F-Box-Protein, welches Auxin bindet (Dharmasiri et al., 2005a, b). Damit werden die ARFs freigesetzt und die Regulierung ihrer Zielgene möglich. Unter diesen befinden sich auch Gene, die für Aux/IAA-Proteine kodieren, was zu einer negativen Rückkopplung und zum sofortigen Signalende beim Rückgang der Auxin-Konzentration führt (Guilfoyle und Hagen, 2007). In *A. thaliana* fungieren nur ARF5, -6, -7, -8 und 19 als transkriptionelle Aktivatoren, für die in Hefe eine Interaktion mit fast allen Aux/IAAs nachgewiesen wurde (Vernoux et al., 2011). Die restlichen *A. thaliana* ARFs hemmen die Transkription ihrer Zielgene und werden i.d.R. nur von einem oder wenigen Aux/IAAs gebunden. ARF-Aktivatoren und –Repressoren regulieren möglicherweise dieselben Zielgene (Ulmasov et al., 1999). Dies verdeutlicht die Komplexität der Auxin-Signalwirkung, da wahrscheinlich die ARF-Aktivatoren mit den ARF-Repressoren um Promoter-Bindestellen konkurrieren (Vernoux et al., 2011).

1.4.2 Biosynthese der GAs

GAs sind an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen beteiligt und vor allem in wachsendem Gewebe zu finden. Sie fördern beispielsweise die Keimung, die Elongation des Sprosses und den Blühbeginn sowie die Fruchtbildung. Tomatenmutanten, die in der

GA-Biosynthese gestört sind oder eine erhöhte GA-Inaktivierung aufweisen, bilden keine Samen oder Früchte (Bensen und Zeewaat, 1990).

Die Biosynthese (Abb. 9) beginnt mit der Bildung von *ent*-Kauren aus *trans*-Geranylgeranyldiphosphat. Die Synthese erfolgt in zwei Schritten über die Bildung von *ent*-Copalyldiphosphat, katalysiert durch die *ent*-Copalyldiphosphat-Synthase (CPS) und die *ent*-Kauren-Synthase (KS). *Ent*-Kauren wird schließlich in die allen Pflanzen gemeinsame Vorstufe aller GAs, GA_{12} , konvertiert. Dies geschieht durch sechs Oxidations-Schritte, die durch zwei Membran-gebundene Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert werden. Dies sind zum einen die *ent*-Kauren-Oxidase (KO) und die *ent*-Kaurensäure-Oxidase (KAO), die beide im endoplasmatischen Retikulum und erstere auch in der Plastiden-Membran lokalisiert sind. Alle bisher genannten Enzyme werden i.d.R. jeweils durch ein einzelnes Gen kodiert (Bensen und Zeewaat, 1990; Hedden und Thomas, 2012). Abhängig von der Pflanzenart wird GA_{12} an Position C13 und/ oder C20 hydroxyliert. Dennoch werden GA_{12} und GA_{53} in zwei parallelen Wegen am C20-Atom in drei oder vier cytosolischen Schritten zu GA_9 und GA_{20} oxidiert. Diese schrittweisen Oxidationen der Methylgruppe zu einem Alkohol, Aldehyd und schließlich γ -Lacton, werden durch die GA 20-Oxidasen, 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen, katalysiert. Final kommt es zur 3β -Hydroxylierung von GA_9 und GA_{20} durch eine weitere Gruppe von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, den GA 3β -Hydroxylasen, sodass die biologisch aktiven Formen GA_4 und GA_1 (Hauptform in Tomate) entstehen. In einigen Arten oder bestimmten Geweben ist die letzte Reaktion nicht regiospezifisch und es kommt zusätzlich zur Bildung von GA_5 und GA_3 (Hedden und Thomas, 2012). Die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen werden in allen Pflanzenarten durch mehrere Gene kodiert.

Die Deaktivierung der GAs erfolgt hauptsächlich durch die 2β -Hydroxylierung, katalysiert von den GA 2-Oxidasen, die in Tomate durch elf Proteine vertreten sind (Chen et al., 2016a). Es ist naheliegend, dass die GA-Homöostase u.a. über die Aktivität der GA 2-Oxidasen reguliert wird. Die Expression der die Enzyme kodierenden Gene wird durch GA erhöht (Thomas et al., 1999).

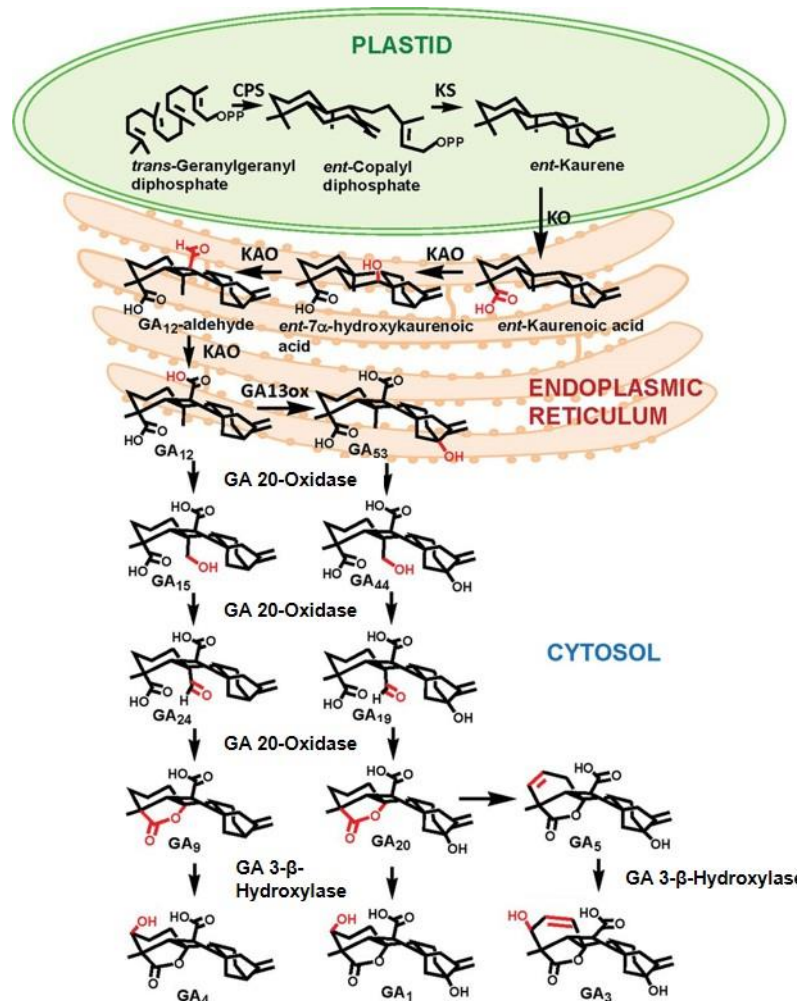


Abb. 9: **GA-Biosyntheseweg** (Hedden und Thomas, 2012)

Gezeigt sind die parallelen Wege mit oder ohne C13-Hydroxylierung von GA₁₂. In Tomate beschreibt das über die C13-Hydroxylierung gebildete GA₁ die vorherrschende biologisch aktive Form.

1.4.3 Auxine und GAs in der Blüten- und Fruchtentwicklung

Einen *cross-talk* zwischen JA-Ile und Auxinen innerhalb der Regulierung der Blütenentwicklung wurde in *A. thaliana* bereits mehrmals nachgewiesen. So fördern ARF6 und ARF8 die Kron-, Staub- und Fruchtblattentwicklung zum Teil vermittelt über die Initiierung der JA-Biosynthese und Expression von *AtMYB21* und *AtMYB24* (Nagpal et al., 2005; Reeves et al., 2012). Zusätzlich reguliert Auxin zumindest bei der Antherendehiszenz die JA-Wirkung durch eine Hemmung des JA-vermittelten Aufreißen des Stomiums vor der Anthese auch negativ (Cecchetti et al., 2013).

GA-Funktionen in der Blütenentwicklung zeigt beispielsweise die fehlende Filamentelongation in der GA-Biosynthesemutante *ga1-3* in *A. thaliana*. Das Auftreten der kurzen Filamente wird zumindest zum Teil durch den Einfluss von GA auf die JA-Biosynthese und damit auf die Expression von *AtMYB21*, *AtMYB24* und *AtMYB57* erklärt (Cheng et al., 2009). Einen *cross-talk* zwischen GAs und JA-Ile postuliert auch eine

Studie zu dem JA-regulierten Glucosinolat-Transporter GRT1, der sowohl JA-Ile als auch GA transportiert. Dabei weist *Atgtr1* eine gestörte Staubblattentwicklung auf, die durch eine GA-Behandlung wieder aufgehoben werden kann (Saito et al., 2015).

Untersuchungen zur Interaktion von Phytohormonen während der Blütenentwicklung in Pflanzenarten neben *A. thaliana* sind bislang deutlich unterrepräsentiert.

Mehr Kenntnisse aus Arten mit fleischigen Früchten bestehen für die hormonelle Regulierung der Initiierung der Fruchtbildung, die ebenso das Zusammenspiel mehrerer Phytohormone erfordert (Sun et al., 2010). Dabei sind Auxine und GAs besonders hervorzuheben (Sawhney et al., 1983; Olimpieri et al., 2007; Serrani et al., 2010). Insbesondere für ARF5, ARF6, ARF7, ARF8 und IAA9 sowie DELLA wurden regulatorische Funktionen in Tomate nachgewiesen (Wang et al., 2009; Goetz et al., 2007; de Jong et al., 2011; Liu et al., 2014; Liu et al., 2018; Hu et al., 2018).

1.4.4 Kultivar MicroTom zur Untersuchung hormonregulierter Prozesse

Solanum lycopersicum etabliert sich mehr und mehr zu einem Modellorganismus in der pflanzlichen Molekularbiologie. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Kultivar MicroTom gearbeitet, welches durch seine kleine Pflanzengröße, einer großen Blütenanzahl und verhältnismäßig einfacher Transformierbarkeit Vorteile im biologischen Arbeiten bietet. Die Nachteile sind vorhandene Genommutationen. Zum einen trägt es eine Punktmutation im *Self-Pruning*-Gen (Pnueli et al., 1998). Für den Zwergenwuchs ist allerdings eine Mutation im *Dwarf*-Gen, welches für eine Brassinosteroid-6-Oxidase kodiert, verantwortlich (Martí et al., 2006). Die MicroTom ist Brassinosteroid-defizient. Zusätzlich trägt das Kultivar noch mindestens eine weitere, nicht charakterisierte Mutation (*miniature*), die zur Reduzierung der Internodien-Länge führt, jedoch unabhängig von veränderten GA-Gehalten. Die Gehalte an bioaktiven GAs sind vergleichbar zu jenen in großen Kultivaren, wie Ailsa Craig, UC-82 und Rutgers (Martí et al., 2006). MicroTom zeigt keine veränderten Reaktionen von unbefruchteten Samenanlagen auf die Behandlung mit GAs oder Auxinen im Vergleich zu großen Kultivaren (Serrani et al., 2007). Somit eignet sich dieses Tomatenkultivar zur Untersuchung hormoneller Regulierungen innerhalb der Blütenentwicklung.

1.5 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, detaillierte Erkenntnisse zu den JA-Funktionen in der Blüte von Tomate als einen Vertreter mit fleischigen Früchten zu liefern. Dabei sollte zunächst die zuvor postulierte Interaktion von JA und ET in der Regulation der Staubblattentwicklung überprüft werden. Dazu wurden phänotypische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen einer Doppelmutante vorgenommen, die aus der Kreuzung von *jai1-1* und der ET-insensitiven Mutante *Never ripe (Nr)* generiert wurde.

Hauptfokus der Arbeit lag auf der Identifizierung molekularer Ursachen für die weibliche Sterilität der *jai1-1*-Mutante. Dabei stand die funktionelle Charakterisierung der beiden TFs MYB14 und MYB21 im Fokus, deren Genexpression in *jai1-1*-Samenanlagen signifikant reduziert ist. Die TFs sollten dabei zunächst hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation, ihrer Kapazität zur transkriptionellen Aktivierung und der Interaktion mit JAZ-Repressoren charakterisiert werden.

Zur weiteren funktionellen Charakterisierungen von MYB14 und MYB21 sollten einerseits Überexpressionslinien im *jai1-1*-Hintergrund und andererseits *loss-of-function*-Mutanten im Wildtyp-Hintergrund erzeugt werden.

Alle generierten Mutanten sollten neben der Samenbildung hinsichtlich weiterer phänotypischer Blütenmerkmale und Phytohormongehalte analysiert werden. Außerdem sollten vergleichende Transkriptomanalysen des Fruchtblattes von Wildtyp, *jai1-1* und einer *MYB14*- bzw. *MYB21*-Überexpressions- oder *loss-of-function*-Linie putative Zielgene der TFs identifizieren. Diese Untersuchungen sollten dazu beitragen, Erkenntnisse hinsichtlich der JA-vermittelten *downstream*-Wirkungsweisen von MYB14 und MYB21 in Tomatenfruchtblättern zu erhalten.

2 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die weiterführende Aufklärung der hormonellen Koordination in der Entwicklung fertiler Tomatenblüten mit besonderem Fokus auf der Rolle von JA. Damit sollte ein weiterer Beitrag zur Aufklärung artspezifischer JA-Funktionen in der Blütenentwicklung geleistet werden.

2.1 Jasmonat-Funktion im Staubblatt – *cross-talk* mit ET

Eine Funktion von JA in der späten Staubblattentwicklung hinsichtlich der Hemmung der verfrühten ET-Funktionen wurde bereits nachgewiesen (Dobritsch et al., 2015). So konnte gezeigt werden, dass die JA-insensitive Mutante *jai1-1* erhöhte ET-Gehalte und Transkriptlevel von ET-assoziierten Genen ab dem Blütenstadium 3 aufweist. Dies geht einher mit einer verfrühten Pollenausschüttung und Antherenseneszenz. Die Generierung einer Doppelmutante aus der Kreuzung der *jai1-1*- mit der ET-insensitiven *Nr*-Mutante sollte durch die Analyse der beeinträchtigten phänotypischen Merkmale des Staubblatts den dazu funktionellen Beweis erbringen: Wenn JA die verfrühte ET-Generierung verhindert, sollte sich die Doppelmutante eher wie der Wildtyp verhalten als wie *jai1-1*. Ein Teil dieser Arbeit ist bereits in Dobritsch et al. (2015) veröffentlicht.

Nr wurde durch einen Screen hinsichtlich einer Reaktion auf ET selektiert (Lanahan et al., 1994). Die Mutante zeigt keinen *triple response* zu ET im Keimlingsstadium, wobei der Wildtyp ein kurzes, verdicktes Hypokotyl mit Haken und eine kurze, gekräuselte Keimwurzel bildet. In der Blütenentwicklung kommt es zur fehlenden Seneszenz der Kron- und Staubblätter, die sich nur aufgrund des wachsenden Fruchtknotens lösen. Die Früchte reifen nicht komplett und bleiben orange. Die Ursache des Phänotyps ist eine nicht-synonyme Punktmutation im den ET-Rezeptor 3 kodierenden Gen (*Solyc09g075440*), die zu einem Austausch von Prolin zu Leucin im Protein führt (Wilkinson et al., 1995). Es handelt sich um eine kodominante Mutation, das heißt sowohl Wildtyp- als auch Mutanten-Merkmale werden ausgeprägt, wodurch in heterozygoten Pflanzen ein intermediärer Phänotyp vorliegt (Lanahan et al., 1994). *Nr*-Pflanzen sind ET-unempfindlich, die ET-Biosynthese ist nicht beeinträchtigt.

2.1.1 Pollenvitalität

Eine deutliche Beeinträchtigung in der Bildung lebensfähiger Pollen ist in *jai1-1* bekannt (Li et al., 2004). Somit scheint JA für die Entwicklung vitaler Pollen über die gesamte Lebenszeit der Anthere essenziell zu sein. Dennoch sollte getestet werden, ob die in Dobritsch et al. (2015) postulierte Hemmung der ET-Funktionen durch JA in der späten Staubblattentwicklung für die Pollenvitalität relevant ist. Die Ergebnisse zeigen allerdings

keine direkte Funktion von ET in der Bildung vitaler Pollen, was die vergleichbare Anzahl an lebenden Pollen zum Wildtyp in *Nr* zeigte (Abb. 10). Jedoch fanden sich in der Doppelmutante *jai1-1Nr* zwar deutlich weniger lebende Pollen als im Wildtyp, aber dennoch signifikant mehr als in *jai1-1* (Abb. 10). Die beschriebene verfrühte Seneszenz in Staubblättern der *jai1-1* (Dobritzsch et al., 2015) scheint somit zusätzlich Pollen in den späten Stadien der Blütenentwicklung zu schädigen, was in der Doppelmutante ausblieb. Dennoch zeigten die Ergebnisse, dass die Interaktion von JA und ET für die Pollenentwicklung *per se* nicht relevant zu sein scheint.

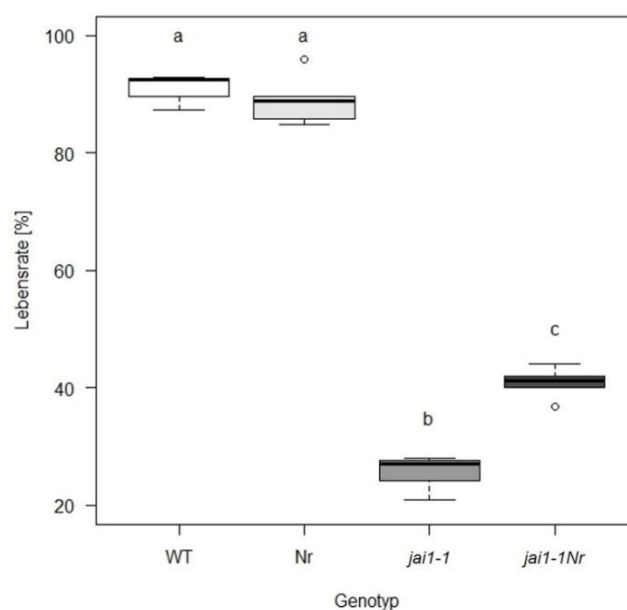


Abb. 10: **Lebensrate von Pollen der geöffneten Blüte von Wildtyp (WT), *Nr*, *jai1-1* u. *jai1-1Nr*** Boxplots zeigen Mediane (Querbalken), 25- 75 % Interquartilabstände (Boxen) und Datenverteilung (Fehlerbalken). Ausreißer (> 1,5-facher Interquartilabstand) sind als Punkte dargestellt. Die Pollenvitalität wurde mittels FDA-Färbung anhand der Anzahl der fluoreszenten Pollen von 900 gezählten Pollen mit $n = 5$ bestimmt. Signifikante Unterschiede wurden mittels 1-faktorieller ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test ermittelt ($p \leq 0,05$) und sind durch unterschiedliche Buchstaben dargestellt.

2.1.2 Stomiumriss im Blütenstadium 4

Ein Merkmal der späten Staubblattentwicklung ist der Riss des Stomiums, welcher die Pollenfreigabe ermöglicht. Ein Einfluss von JA wurde durch eine verfrühte Pollenausschüttung, einhergehend mit einem vorzeitigen Riss des Stomiums in der bereits gelblichen, aber noch geschlossenen Knospe (Blütenstadium 4) in *jai1-1*-Antheren nachgewiesen (Dobritzsch et al., 2015). Aufgrund dessen sollte eine JA-Funktion in der Regulierung von ET innerhalb dieses Prozesses getestet werden. Tatsächlich erfolgte der verfrühte Riss des Stomiums nicht in *jai1-1Nr*, wodurch die Doppelmutante dem Wildtyp entsprach (Abb. 11; Dobritzsch et al., 2015). Damit glich die

Nr-Mutation die Defekte aus der JA-Insensitivität aus. Dies ist ein starkes Indiz für eine JA-gesteuerte Hemmung des ET-vermittelten Aufreißens des Stomiums vor der Blütenöffnung. Damit könnte in Tomatenstaubblättern JA gegenteilig zu *A. thaliana* wirken, wobei JA den Stomiumriss vor der Anthese ohne das Wirken von Auxin fördern würde (Cecchetti et al., 2013).

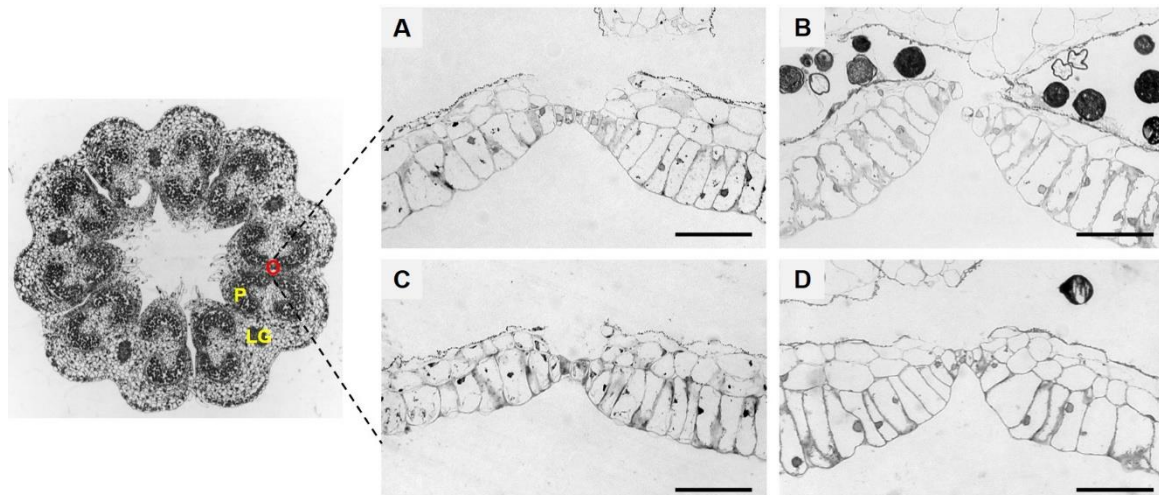


Abb. 11: **Toluidin-blau gefärbte Semidünnschnitte der Stomiumregion von Antheren** Links ist ein Querschnitt der gesamten Antherenkron mit Leitgewebe (LG), Pollen (P) und der Markierung eines Stomiumbereiches gezeigt. Rechts sind die Stomiumregionen im Blütenstadium 4 von (A) Wildtyp, (B) *jai1-1*, (C) *Nr* und (D) *jai1-1Nr* aus Dobritsch et al. (2015) zu sehen. Die Maßstäbe entsprechen 50 µm.

2.1.3 Wassergehalt in der offenen Blüte

Ein weiterer *jai1-1*-Phänotyp ist die im Vergleich zum Wildtyp verfrühte Seneszenz der Antherenspitze, was sich durch einen geringeren Wassergehalt des gesamten Staubblattes der geöffneten Blüte widerspiegelt (Dobritsch et al., 2015). Daher sollte auch hier eine Wirkung von JA auf die ET-Signalwirkung untersucht werden. Dabei lag der Wassergehalt der Doppelmutante *jai1-1Nr* im Großteil der Proben bei über 75 % und war damit vergleichbar zum Wildtyp (Abb. 12). Der Einfluss der *Nr*-Mutation führte somit zur vollständigen Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Dies deutet auf eine Interaktion von JA und ET in der Regulierung des Wassergehaltes im Staubblatt der späten Blütenstadien hin.

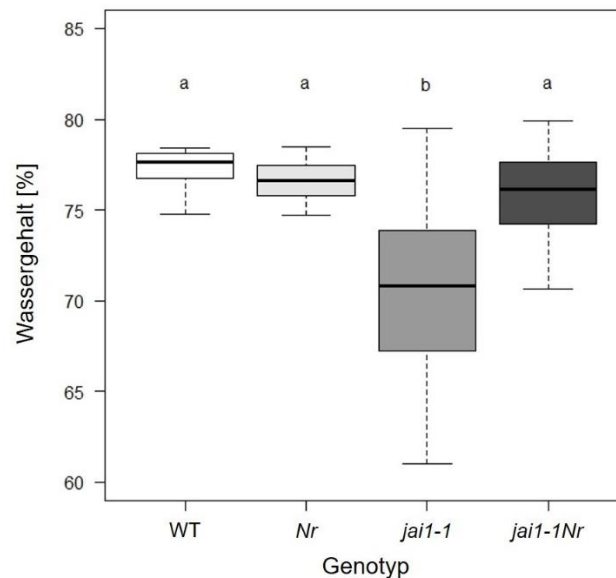


Abb. 12: **Wassergehalt der Staubblätter der geöffneten Blüte im WT, Nr, *jai1-1* u. *jai1-1Nr***
 Boxplots zeigen Mediane (Querbalken), 25 - 75 % Interquartilabstände (Boxen) und Datenverteilung (Fehlerbalken). Signifikante Unterschiede wurden mittels 1-faktorieller ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test ermittelt ($p \leq 0,05$; $n = 20 - 28$) und sind durch unterschiedliche Buchstaben dargestellt.

2.1.4 Genexpression ausgewählter JA- und ET-assoziiertes Gene

Um putative Gene zu finden, die an der späten JA-abhängigen Staubblattentwicklung beteiligt sind, wurden *real-time quantitative PCR* (qPCR)-Analysen von 46 ausgewählten Genen durchgeführt. Für die Genauswahl dienten die Transkriptomdaten der Staubblätter von Wildtyp und *jai1-1* als Grundlage (Doktorarbeit Susanne Dobritzsch) mit Hinblick auf sehr unterschiedlicher Expressionswerte zwischen beiden Genotypen hauptsächlich aus den Gruppen der TFs, ET-, Zelltod- und JA-assoziierten Genen. Für die Analysen wurde das Fluidigm-System, ein hochsensitives Hochdurchsatz-qPCR-System, genutzt. Bei der Analyse amplifizierten allerdings nur 24 Primerpaare spezifische PCR-Produkte (Tab. 1). Die einzelnen Cq-Werte, die kalkulierten relativen Expressionswerte sowie die Datentabellen für die statistischen Analysen sind auf der beigefügten CD zu finden. Von den 24 Genen zeigten lediglich acht Gene signifikante Expressionsunterschiede zwischen den vier Genotypen. Dabei verhielt sich die Doppelmutante *jai1-1Nr* immer wie *jai1-1* und nicht wie der Wildtyp (Tab. 1 und Anhang Tab. 9, CD). Eine hierarchische Cluster-Analyse mit den Mittelwerten aller Expressionswerte ließ dieselben Zusammenhänge erkennen: Der Wildtyp bildete mit *Nr* und *jai1-1* mit *jai1-1Nr* jeweils einen separaten Zweig (Abb. 13). Innerhalb der Zweige clusterten jeweils die einzelnen Blütenstadien zusammen, bis auf Wildtyp und *Nr* im Stadium 5 und 6 (Abb. 13). Der Verlust der ET-Perzeption hatte somit keinen Einfluss

auf die Expression der untersuchten Gene im Hintergrund der *jai1-1*-Mutation. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die hier ausgewählten Gene an der Komplementation der gezeigten phänotypischen Merkmale beteiligt sind. Die ursprüngliche Auswahl der Gene erfolgte nur aus einem Teil des erwähnten Transkriptomdatensatzes, da diesem nur eine unzureichende Annotation zugrunde lag, die manuell erweitert werden musste (Susanne Dobritsch, pers. Mitteilung). Es ist somit wahrscheinlich, dass wichtige JA- und ET-regulierte Gene nicht ausgewählt wurden. Eine weitere Möglichkeit sind zeitlich stark begrenzte Expressionsspitzen wichtiger regulatorischer Gene, die in der Arbeit nicht erfasst wurden. Aufgrund der vergleichsweise kleinen Anzahl von Genen, die letztendlich mittels des Fluidigm-Systems analysiert werden konnten, sollte evtl. eine vergleichende Gesamt-Transkriptomanalyse von zwei Tageszeitpunkten erhoben werden, um die teilweise Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps molekular erklären zu können.

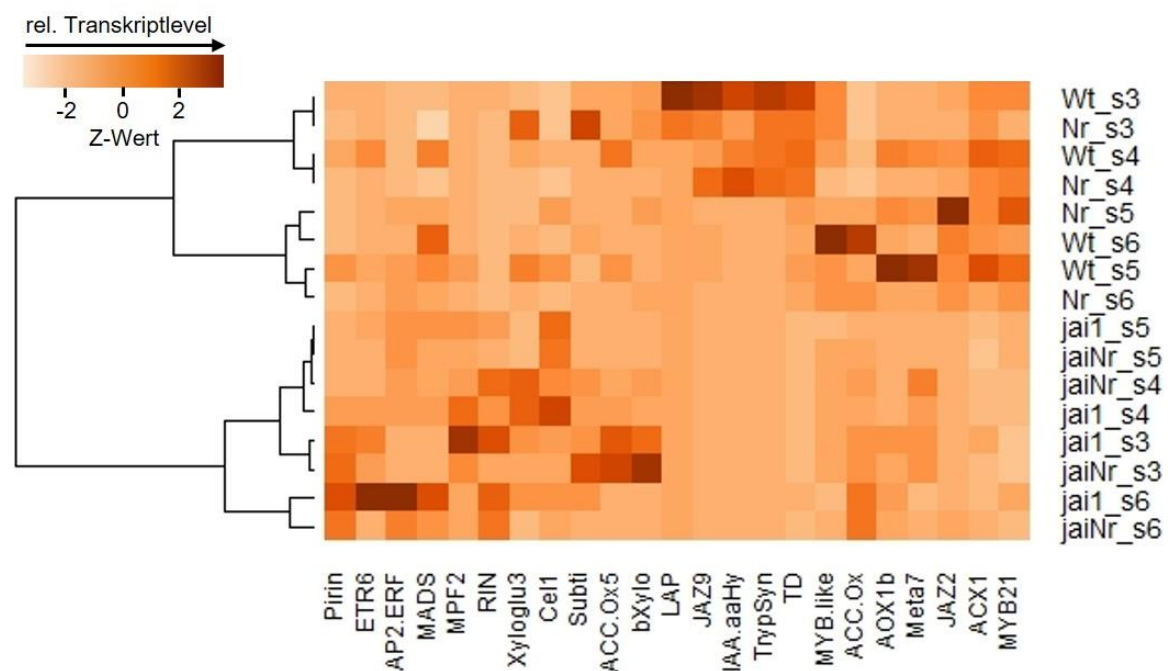


Abb. 13: Heatmap mit spaltenweiser Mittelwert-Normierung der relativen Expressionswerte ausgewählter Gene in Staubblättern

Die Proben umfassten Wildtyp (Wt), *Nr*, *jai1-1* (*jai1*) und *jai1-1Nr* (*jaiNr*) in den Blütenstadien (s) 3 bis 6. Als Abstandsmaß für das hierarchische Clustern der Genotypen und Stadien diente der Pearson-Korrelationskoeffizient mit *complete linkage*.

Tab. 1: **Übersicht der für die Auswertung der Fluidigm-qPCRs genutzten Gene**

Grundlage waren Staubblattproben von WT, *Nr*, *jai1-1* und *jai1-1Nr* in den Blütenstadien 3 bis 6. Signifikanzen wurden laut 1-faktorieller ANOVA (Genotyp; $p \leq 0,05$) mit den logarithmierten relativen Expressionswerten, gefolgt vom Tukey-Test ($n = 3$) ermittelt.

Solyc-Nummer	Genbezeichnung (Abkürzung)	Signifikante Unterschiede
<i>Solyc05g052610</i>	MYB-TF (MYB-like)	
<i>Solyc04g076280</i>	MADS-Box MPF2-like TF (MPF2)	
<i>Solyc04g076700</i>	MADS-Box TF (MADS)	
<i>Solyc05g012020</i>	<i>RIN</i> MADS-Box TF	<i>jai1-1</i> u. <i>jai1-1Nr</i> zu WT u. <i>Nr</i> im Stadium 5
<i>Solyc04g071770</i>	AP2/ERF-TF	
<i>Solyc10g086250</i>	MYB-TF AN2	
<i>Solyc02g092570</i>	GRAS-family TF	alle Mutanten zu WT im Stadium 6
<i>Solyc07g026650</i>	ACC-Oxidase 5 (ACC.Ox5)	
<i>Solyc02g036350</i>	ACC-Oxidase (ACC.Ox)	<i>jai1-1</i> u. <i>jai1-1Nr</i> zu WT u. <i>Nr</i> im Stadium 4
<i>Solyc08g075550</i>	Alternative Oxidase 1b (AOX1b)	
<i>Solyc09g089610</i>	Ethylenrezeptor 6 (ETR6)	
<i>Solyc09g098160</i>	<i>PIRIN</i>	
<i>Solyc05g006220</i>	IAA-Aminosäuren-Hydrolase (IAA-aaHy)	<i>jai1-1</i> u. <i>jai1-1Nr</i> zu WT u. <i>Nr</i> im Stadium 3 u. 4
<i>Solyc10g005320</i>	Tryptophan-Synthase (TrypSyn)	<i>jai1-1</i> u. <i>jai1-1Nr</i> zu WT u. <i>Nr</i> im Stadium 3
<i>Solyc08g081620</i>	Endo-1,4- β -Glucanase (<i>Cel1</i>)	alle Mutanten zu WT und <i>Nr</i> zu <i>jai1-1</i> u. <i>jai1-1Nr</i>
<i>Solyc03g093130</i>	Xyloglucan-endotransglucosylase-Hydrolase 3 (Xyloglu3)	
<i>Solyc10g081300</i>	Metacaspase 7 (Meta7)	
<i>Solyc01g087800</i>	Subtilisin-like Protease (Subti)	
<i>Solyc08g078390</i>	Acyl-CoA Oxidase 1A (ACX1)	
<i>Solyc09g008670</i>	Threonin-Deaminase (TD)	<i>jai1-1</i> u. <i>jai1-1Nr</i> zu WT u. <i>Nr</i> im Stadium 4 u. 5
<i>Solyc12g010040</i>	Leucin-Aminopeptidase (LAP)	
<i>Solyc02g067760</i>	MYB21	<i>jai1-1</i> u. <i>jai1-1Nr</i> zu WT u. <i>Nr</i> im Stadium 4 u. 5
<i>Solyc12g009220</i>	JAZ2	
<i>Solyc08g036640</i>	JAZ9	

2.2 Jasmonat-Funktionen im Fruchtblatt – MYB14 und MYB21

Aufgrund der weiblichen Sterilität in *jai1-1* war die Untersuchung von Prozessen im Fruchtblatt der Tomate von besonderem Interesse. Die zugrunde liegende Transkriptomanalyse von Samenanlagen der Mutante im Vergleich zum Wildtyp zeigte eine hohe Expression der beiden MYB-TFs *MYB14* und *MYB21* im mittleren Blütenstadium im Wildtyp, welche in *jai1-1* komplett ausblieb (Schubert et al., 2019). Dies könnte auf eine mögliche Funktion in der Entwicklung der Samenanlagen hinweisen. Somit stellt die Charakterisierung der beiden MYB-Faktoren in Tomate den Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit dar. Dabei stand MYB21 aufgrund der bereits bekannten Funktionen in der Blütenentwicklung in *A. thaliana* im Mittelpunkt (Mandaokar et al., 2006; Song et al., 2011; Reeves et al., 2012). Die Arbeit beschreibt die allgemeine Charakterisierung hinsichtlich der Lokalisation und Interaktion mit putativen Regulatoren sowie die funktionale Charakterisierung von Mutanten.

2.2.1 Subzelluläre Lokalisation von MYB14 und MYB21

Zur Bestimmung der Lokalisation der MYB-TFs innerhalb der Zelle wurden Konstrukte mit *N*- oder *C*-terminaler GFP-Fusion der genomischen Sequenz von *MYB21* und *MYB14* unter der Kontrolle des *Cauliflower Mosaic Virus 35S (35S)*-Promoters generiert. Das zweite Intron von *MYB21* wurde dabei von 2435 bp auf nur 231 bp gekürzt, wobei die Erhaltung der Intron-Erkennung per Datenbank überprüft wurde. Die transiente Expression der Konstrukte in *Nicotiana benthamiana*-Blättern führte nur bei der Verwendung der MYB21-Vektoren zur Generierung eines GFP-Signals, wobei dessen Fusion am *N*- oder *C*-Terminus keine Unterschiede erkennen ließ. Dabei konnte deutlich die Lokalisation des Fusionsproteins im Zellkern nachgewiesen werden (exemplarisch die *C*-terminale Fusion Abb. 14 A). Zusätzlich ließ sich eine schwache Fluoreszenz im Cytoplasma detektieren, wobei es sich nicht um freies GFP handelte, was ein Western-Blot von aus den Blättern extrahiertem Gesamtprotein verdeutlichte (Abb. 14 B). Unter Verwendung eines GFP-Antikörpers ließ sich nur eine Bande mit einer Größe von ca. 50 kDa nachweisen, die der erwartenden Größe von MYB21:GFP und damit nicht des freien GFPs mit ca. 25 kDa entspricht.

Ein MYB14:GFP-Fusionsprotein ließ sich nach der transienten Transformation von *N. benthamiana*-Blättern nicht nachweisen. Deshalb wurden Mesophyll-Protoplasten von *N. benthamiana* eingesetzt, in denen ein schwaches GFP-Signal im Zellkern zu erkennen war (Abb. 14C).

Somit ließ sich sowohl für MYB21 als auch für MYB14 eine Lokalisation im Zellkern nachweisen, wie es für putative TFs zu erwarten war.

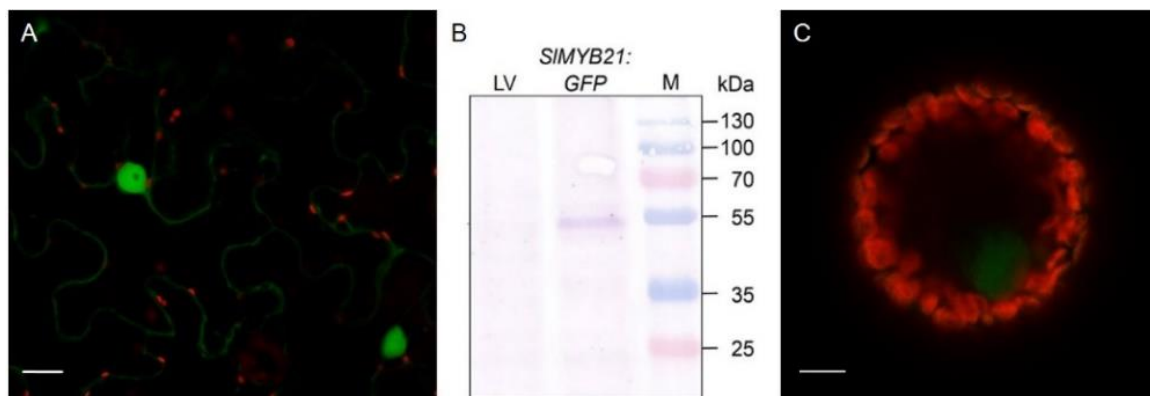


Abb. 14: **Lokalisation von MYB21 und MYB14**

A: transiente Expression von *35S::gMYB21:GFP* in *N. benthamiana*-Blättern. Die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins ließ sich in den Zellkernen der Epidermiszellen detektieren. Die Chloroplasten zeigten rote Autofluoreszenz. Der Maßstab beträgt 20 µm.

B: Western-Blot-Analyse mit Gesamtproteinextrakt aus transient transformierten Blättern mit Leervektor (LV) und *35S::gMYB21:GFP* mit primärem anti-GFP-Antikörper

C: Expression von *35S::gMYB14:GFP* in *N. benthamiana*-Protoplasten. Die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins ließ sich im Zellkern nachweisen. Der Maßstab beträgt 10 µm.

Die Abbildung ist aus Schubert et al. (2019) entnommen.

2.2.2 Transkriptionelle Aktivität von MYB21

Da MYB21 in Tomate nur anhand der Orthologie zu *A. thaliana* definiert wurde, sollte dessen tatsächliche Aktivität als TF geprüft werden. Dazu wurde das Hefe-Ein-Hybrid-System in abgewandelter Form genutzt. Die kodierende Sequenz von *MYB21* wurde an die DNA-Bindedomäne des *GAL4*-TF fusioniert und aufgrund der Verfügbarkeit von *Yeast-Synthetic-Drop-out-Medium* (SD) ohne Tryptophan und Leucin zusammen mit dem Leervektor mit der *GAL4*-Aktivierungsdomäne in Hefe exprimiert. Abbildung 15 zeigt, dass MYB21 in der Lage war, die Transkription der Reportergene in Hefe zu aktivieren. Dabei schien auch ein C-terminaler Flag-Tag keinen negativen Einfluss zu haben. Somit wurde MYB21 aus Tomate in seiner Funktion als TF bestätigt.



Abb. 15: **Hefe-Assay zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität von MYB21**

Hefe wurde mit *MYB21* bzw. *MYB21:Flag* fusioniert an die *GAL4*-Bindedomäne und dem leeren Vektor mit der *GAL4*-Aktivierungsdomäne transformiert und zur Transformationskontrolle auf SD-Medium ohne Tryptophan (T) und Leucin (L) und zum Nachweis der transkriptionellen Aktivität auf Medium zusätzlich ohne Histidin (H) kultiviert. Beide Vektoren ohne Insert (LV) dienen als Negativkontrolle.

2.2.3 Putative Interaktion von MYB21 mit JAZ-Proteinen

Um Hinweise auf *downstream* Regulierungen von MYB21 zu erlangen sowie auf ähnliche Regulierungsmechanismen wie in *A. thaliana* zu prüfen, sollte MYB21 auf eine putative Interaktion mit JAZ-Proteinen untersucht werden.

2.2.3.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Zunächst wurde eine mögliche Interaktion mittels dem Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht. Dabei musste MYB21 aufgrund dessen transkriptioneller Aktivität an den C-Terminus der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert werden. Dementsprechend wurden die einzelnen JAZ-Proteine an den C-Terminus der GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert. Die Analyse zeigte nur eine Interaktion von MYB21 mit JAZ9 (Abb. 16). Allerdings wurde die Hefetransformation fünf Mal durchgeführt und nur zwei Mal konnte diese Interaktion gezeigt werden. Western-Blot-Analysen zum Nachweis der GAL4-Bindedomäne bzw. –Aktivierungsdomäne schlugen aufgrund fehlender spezifischer Antikörper fehl. Daher kann die Möglichkeit von fehlenden Interaktionen aufgrund einer fehlenden Expression der Fusionsproteine nicht ausgeschlossen werden.

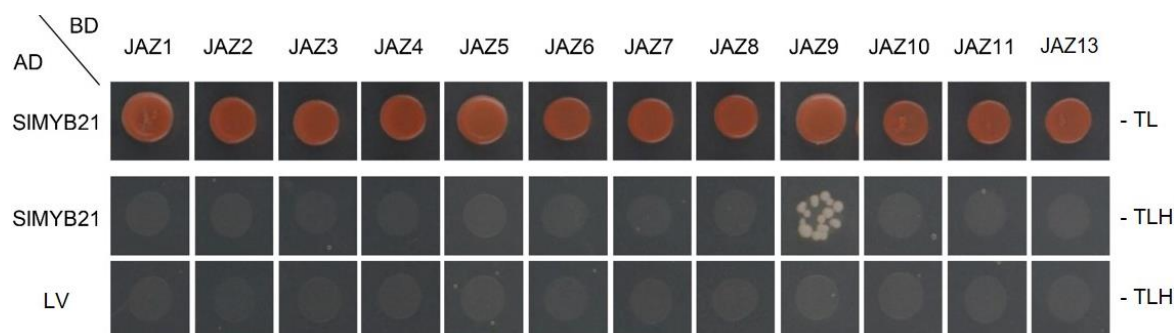


Abb. 16: **Hefe-Zwei-Hybrid-System zur Detektion der putativen Interaktion von MYB21 mit zwölf JAZ-Proteinen.**

MYB21 wurde fusioniert an die GAL4-Aktivierungsdomäne und die einzelnen JAZs fusioniert an die GAL4-DNA-Bindedomäne in Hefe transformiert und auf SD-Medium ohne Tryptophan (T), Leucin (L) zur Transformationskontrolle und ohne Histidin (H) zum Nachweis der Aktivierung der Reportergene kultiviert. LV bezeichnete die Negativkontrolle mit beiden Plasmiden als Leervektoren, die nur die Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne des GAL4-TF enthielten. Die Abbildung ist aus Schubert et al. (2019) entnommen.

2.2.3.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Da die Hefe-Zwei-Hybrid-Studien keine eindeutigen Aussagen zuließen, wurde eine zweite Methode angewendet. Die BiFC lässt bei der Interaktion der putativen Proteinpartner, die fusioniert an je eine Hälfte des YFP-Proteins vorliegen, ein Fluoreszenzsignal detektieren. Dabei kann die Position sowie die Hälfte des Fluoreszenzproteins am zu untersuchenden Proteinpaar eine Rolle spielen, wodurch sich für jedes JAZ-Protein vier Kombinationsmöglichkeiten ergaben. In der vorliegenden

Arbeit wurden „2in1“-Vektoren verwendet, in denen die Expressionseinheiten für beide Interaktionspartner sowie RFP als Transformationskontrolle vorliegen (Grefen und Blatt, 2012). Protoplasten aus *N. benthamiana*-Mesophyllzellen wurden mit den generierten Vektoren transformiert. Nach entsprechenden Vorversuchen mit zwei JAZ-Proteinen zeigten sich die Kombinationen, in denen MYB21 C-terminal und die einzelnen JAZs N-terminal getaggt wurden, als am geeignetsten um eine Interaktion nachzuweisen. Bei der Analyse aller zwölf JAZ-Proteine zeigte sich schließlich nur für JAZ9 und JAZ8 eine Interaktion mit MYB21, was das YFP-Signal im Zellkern verdeutlichte (Abb. 17). Für die übrigen JAZs (SIJAZX) zeigte sich neben dem RFP- kein weiteres Fluoreszenzsignal und somit keine Interaktion, was in Abb. 17 exemplarisch zu sehen ist. Als Positivkontrolle diente die bekannte Interaktion von MYC2 und JAZ1 aus *A. thaliana*.

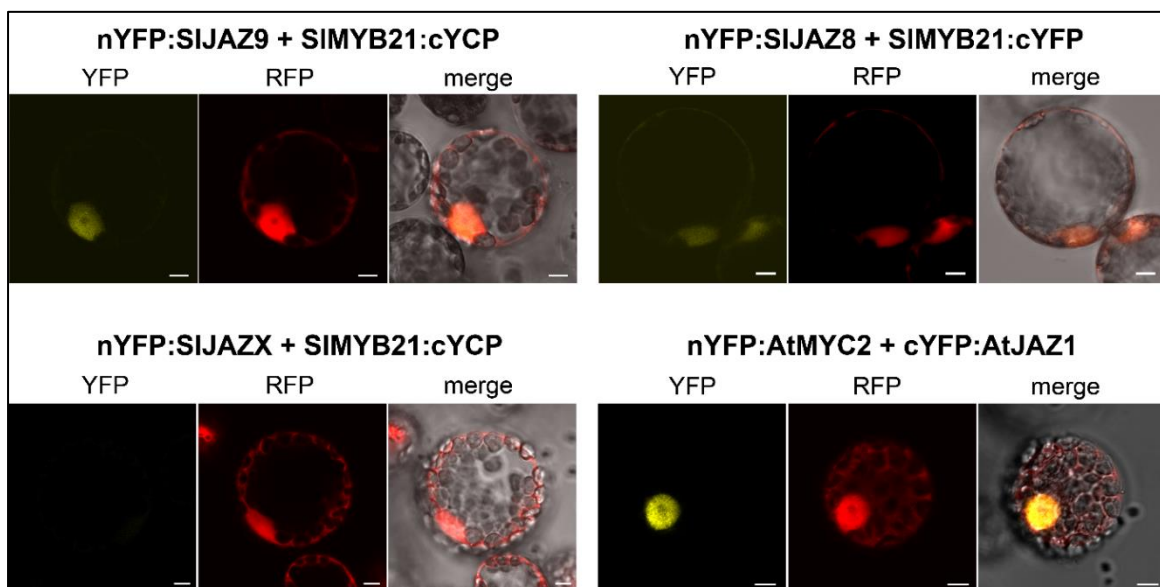


Abb. 17: BiFC-Studien in *N. benthamiana*-Protoplasten

Das rote RFP-Signal ließ sich im Cytoplasma und Zellkern, und das gelbe YFP-Signal im Zellkern detektieren. Die jeweiligen JAZ-Proteine lagen als C-terminale Fusionen des nYFP-Teils und MYB21 als N-terminale Fusionen des cYFP-Teils vor. MYC2 und JAZ1 aus *A. thaliana* dienen als Positivkontrolle mit einem starkem gelbem Fluoreszenzsignal im Zellkern. Die Protoplastentransformation wurden jeweils zwei Mal durchgeführt. Die Abbildung ist aus Schubert et al. (2019) entnommen.

2.2.3.3 Interaktionstest mittels *splitTALE* (*transcription activator-like effectors*)

JAZ8 ist laut eFP-Browser Datenbank (Winter et al., 2007; Tomato Genome Consortium, 2012) nur in Wurzeln exprimiert, was die biologische Relevanz dieser Interaktion in Frage stellt. Um die Interaktion mit JAZ9 noch stärker zu untermauern, sollte eine weitere *in planta* Methode getestet werden, bei der eine Proteininteraktion die Expression eines Reportergens nach sich zieht. Dazu wurde das *splitTALE*-System genutzt, wobei ein synthetischer Promoter die Expression der β -Glucuronidase (*GUS*)

reguliert (Schreiber et al., 2019). Vergleichbar zum Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde die Bindedomäne des TAL-Effektors *N*-terminal an einen der möglichen Interaktionspartner und dessen Aktivierungsdomäne *C*-terminal an den anderen fusioniert. Eine Interaktion der Proteine führt zur Rekonstitution des *TALE* und somit zur Akkumulation von GUS-Protein, dessen Aktivität als Umsatz des Substrates MUG gemessen werden konnte. Da die Position des Tags sterisch eine Rolle spielen kann, wurde MYB21 und JAZ9 sowohl an die Binde- als auch die Aktivierungsdomäne fusioniert und in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert. Dabei ließ die Expression der Fusion von MYB21 an die *TALE*-Aktivierungsdomäne und das Bindedomäne:JAZ9-Fusionsprotein keine GUS-Aktivität erkennen (Abb. 18). Unter Anwendung der zweiten Fusionskombination zeigte bereits die alleinige Expression von MYB21 fusioniert an die Bindedomäne GUS-Aktivität. Bei der Koexpression mit JAZ9 fusioniert an die Aktivierungsdomäne konnte allerdings die Aktivität noch gesteigert werden (Abb. 18). Um die Hintergrundaktivität von MYB21 als transkriptionellen Aktivator zu reduzieren, wurde in einem zweiten Experiment MYB21 mit einer *C*-terminalen Deletion von 25 Aminosäuren und damit ohne putative Aktivierungsdomäne eingesetzt. Dadurch konnte dessen alleinige Aktivität tatsächlich stark herabgesetzt werden und die GUS-Aktivität konnte durch die Koexpression mit dem Fusionsprotein JAZ9:Aktivierungsdomäne um das fast Vierfache erhöht werden. Sie lag dabei allerdings noch weit unter dem Wert aus der Interaktion mit dem Vollängen-MYB21 (Abb. 18). Dennoch zeigte die *splitTALE*-Analyse damit ein starkes Indiz für die Interaktion von MYB21 mit JAZ9.

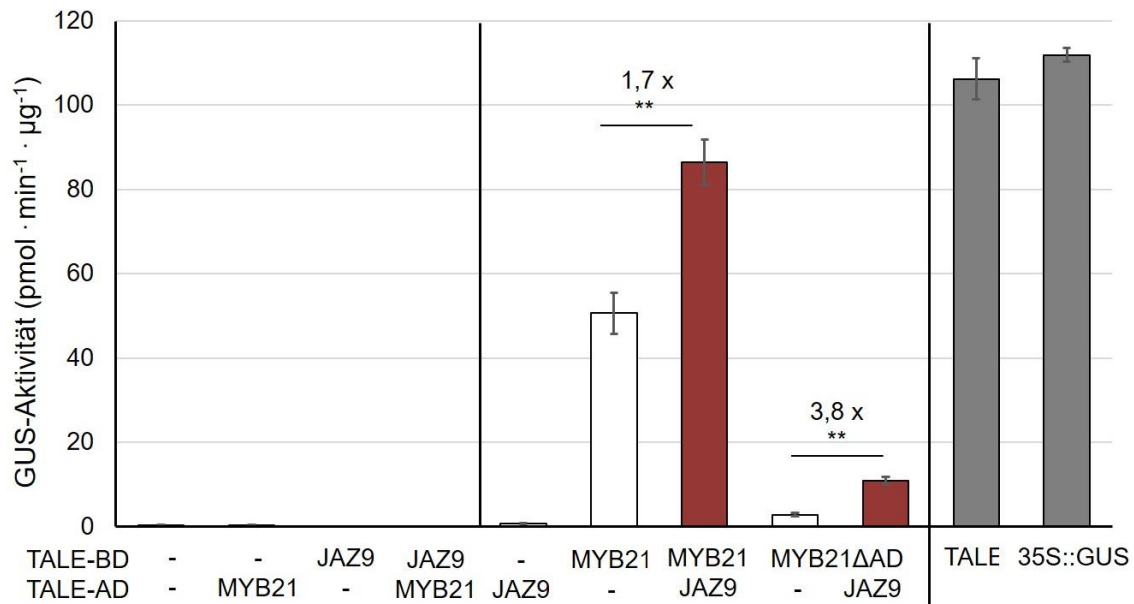


Abb. 18: **MYB21-JAZ9-Interaktion in *N. benthamiana*-Blättern**

Die transiente Transformation von *N. benthamiana* erfolgte mit jeweils drei *A. tumefaciens* Kulturen mit 4xSTAP1::GUS als Reporter und einem der möglichen Interaktionspartnern und 35S::GFP oder den beiden Interaktionspartnern MYB21 und JAZ9 fusioniert an die TALE-Bindedomäne (BD) oder -Aktivierungsdomäne (AD). Es wurden jeweils drei Pflanzen infiltriert. Dabei ist der Mittelwert mit Standardfehler gezeigt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte jeweils zwischen der GUS-Aktivität des MYB21-Hintergrunds und beider Interaktionspartner mittels *student's t-test* (** $p \leq 0.01$). Das Experiment wurde zwei Mal durchgeführt bis auf die nur einmalige Verwendung von MYB21 ohne Aktivierungsdomäne (Δ AD).

Somit konnte mittels drei unterschiedlicher Methoden eine Interaktion von MYB21 mit JAZ9 nachgewiesen werden.

2.2.4 Funktionelle Charakterisierungen von MYB14 und MYB21

Zur Untersuchung der Funktion von MYB14 und MYB21 innerhalb der Blütenentwicklung von Tomate sollten stabile Überexpressions- und *loss-of-function*-Linien erstellt und charakterisiert werden. Dabei sollte die Überexpression in *jai1-1*-Pflanzen erfolgen, während der *loss-of-function* in Wildtyp-Pflanzen durchgeführt wurde. Weiterhin sollten diese Linien genutzt werden, um mögliche Zielgene der TFs zu identifizieren.

2.2.4.1 Optimierung der stabilen Tomatentransformation

Die benötigten Tomaten-Linien wurden mittels somatischer Embryogenese unter Verwendung der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformation von Keimblattstückchen generiert. Dazu wurde das Transformationsprotokoll zunächst erfolgreich optimiert (Abb. 19). Zusammenfassend waren folgende Schritte notwendig, die auf einer Kombination von mehreren veröffentlichten Protokollen beruhen (Fernandez et al., 2009; Cermak et al., 2015):

- die Infiltration der Keimblattstückchen mit Agrobakterien in einer OD₆₀₀ von nur 0,08;
- die Ko-Kultivierung von Tomatengewebe und Agrobakterien auf Medium mit hoher IAA-Konzentration für zwei Tage;
- die Selektion transgener Kalli bzw. Pflänzchen auf Medium beginnend mit hoher Konzentration an *trans*-Zeatinribosid, gefolgt von der Konzentrationshalbierung des *trans*-Zeatinribosids aller zwei Wochen bei gleichbleibender IAA-Konzentration (2 Z- bis 0,5 Z-Medium) und schließlich der Substitution durch Gibberellinsäure (GA-Medium).

Hervorzuheben ist, dass die Konzentration des Selektionsantibiotikums Kanamycin und des Antibiotikums gegen Agrobakterien (Timentin) vom Beginn der Kallusinduzierung bis einschließlich der Bewurzelung gleichbleibend hoch verwendet wurde. Damit konnten letztendlich Kontaminationen durch Agrobakterien verhindert und die Zahl an falsch-positiven Transformanten klein gehalten werden. Die detaillierte Beschreibung des Protokolls ist im Methoden-Teil zu finden.



Abb. 19: **Stabile Tomatentransformation** von der Anzucht der infiltrierten Keimblattstückchen über Kallus- und Sprossbildung bis zur Bewurzelung auf Selektionsmedien

2.2.4.2 Überexpression von *MYB21* und *MYB14* im *jai1-1*-Hintergrund

In *A. thaliana* konnte die *coi1-1*-Mutante durch eine *AtMYB21*-Überexpression erfolgreich komplementiert werden (Song et. al, 2011). Vor diesem Hintergrund sollten *jai1-1*-Pflanzen mit der Wildtyp-kodierenden Sequenz von *MYB14* oder *MYB21* stabil transformiert werden, um deren Funktion in der Ausbildung der weiblichen Fertilität in Tomate zu untersuchen.

2.2.4.2.1 Überexpression mit den kodierenden Sequenzen von *MYB14* und *MYB21*

Zunächst sollte die Überexpression der MYB-Faktoren direkt in *jai1-1*-Pflanzen durch die Transformation mit der kodierenden Sequenz von *MYB14* oder *MYB21* mit jeweils einem C-terminalen *Flag*-Tag erreicht werden. Dabei sollte die Expression entweder durch den konstitutiven 35S-Promoter oder einen in Tomatenblüten bzw. -früchten aktiven Promotor aus Zitrone (*LepC3*; Sorkina et al., 2011) reguliert werden. Dabei wurde für den *LepC3*-Promoter spezifische Aktivität in Antheren, Fruchtblättern und grünen Früchten von Tomate nachgewiesen (Sorkina et al., 2011).

Die Primärtransformanten aus der Transformation mit der kodierenden Sequenz von *MYB14* wurden mit einem Gen-spezifischen und einem OCS-Terminator spezifischen Primer auf Vorhandensein des Transgens geprüft. Dabei erwiesen sich unter Kontrolle des 35S Promoters zwei von drei Linien und unter Kontrolle des *LepC3* Promoters vier Linien von neun Transformanten als transgen. Linie 1 aus der Transformation mit dem 35S-Promoter zeigte eine deutliche Überexpression von *MYB14* im Blatt (Abb. 20). Im Fruchtblatt ließ sich allerdings in keiner Linie eine deutliche Überexpression erkennen. Die höchste Transkriptmenge der mit *LepC3*-Promoter transformierten Pflanzen wies Linie 2 mit einer Verdreifachung im Vergleich zu *jai1-1*-Pflanzen auf (Abb. 20). Alle Linien entwickelten jedoch samenlose Früchte.

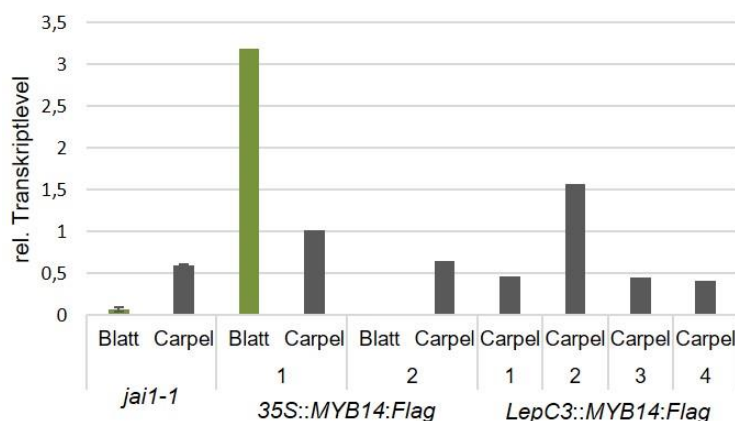


Abb. 20: ***MYB14*-Expression in transgenen *jai1-1*-Linien**

Die Transformation erfolgte mit der CDS von *MYB14* unter Kontrolle des 35S- oder des blütenspezifischen *LepC3*-Promoters. Die relative Transkriptmenge in Bezug auf *TIP41* wurde in Blatt- und Fruchtblatt-Proben der offenen Blüte im Vergleich zu nicht transformierten *jai1-1*-Pflanzen ($n = 3$, \pm Standardfehler) bestimmt.

Für die Expression von *MYB21* in *jai1-1* konnten unter Kontrolle des 35S-Promoters zwei von drei und unter Verwendung des *LepC3*-Promoters zwei von zwei generierten Pflanzen als transgen identifiziert werden. Die Linie 1 der Transformation mit dem 35S-Promoter wies eine ungefähre Verdopplung des *MYB21*-Transkriptgehaltes im Fruchtblatt auf (Abb. 21), die Samenbildung blieb jedoch wie bei allen anderen Transformanten aus.

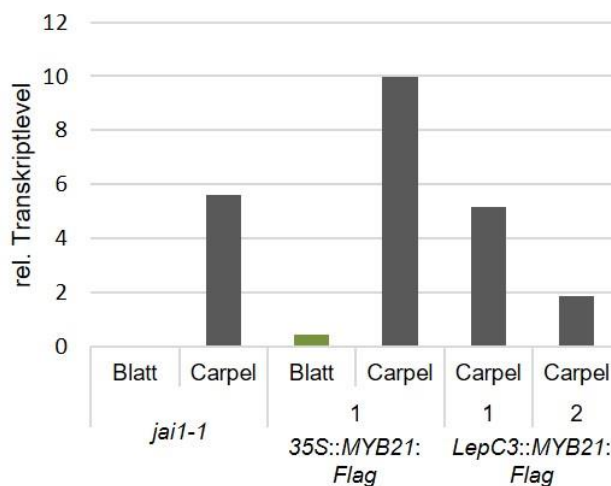


Abb. 21: ***MYB21*-Expression in transgenen *jai1-1*-Linien**

Die Transformation erfolgte mit der CDS von *MYB21* unter Kontrolle des 35S- oder des blütenspezifischen *LepC3*-Promoters. Die relative Transkriptmenge in Bezug auf *TIP41* wurde in Blatt- und Fruchtblatt-Proben der offenen Blüte im Vergleich zu nicht transformierten *jai1-1*-Pflanzen (n = 2) bestimmt.

Damit war die Überexpression der kodierenden Sequenz der beiden MYB-TFs in *jai1-1* nicht erfolgreich. Es konnte keine Wiederherstellung der weiblichen Fertilität oder im Vergleich zu *jai1-1* veränderten Blütenmerkmale beobachtet werden. Dabei war bereits die Überexpression an sich nicht überzeugend. Dies kann u.a. in regulatorischen Elementen in den Introns, instabiler RNA oder einer post-transkriptionellen Regulation begründet liegen.

2.2.4.2.2 Überexpression der genomischen Sequenz von MYB14 und MYB21 unter Kontrolle des 35S-Promoters

Aufgrund der erfolglosen Versuche der MYB-Expression in *jai1-1*-Pflanzen mittels kodierender Sequenz wurden in einem weiteren Ansatz die genomischen Sequenzen (g) der MYB-TFs kloniert. Dabei wurden zunächst *jai1-1*-heterozygote Keimblätter transformiert, um nicht alle transgenen Linien infolge evtl. ausbleibender Samenbildung zu verlieren.

Gleichzeitig sollte sichergestellt werden, dass der *Flag*-Tag die Bildung des Proteins nicht beeinflusst. Dazu wurden die genomischen Sequenzen von *MYB14* und *MYB21*

unter der Kontrolle des 35S-Promoters transient in *N. benthamiana*-Blättern exprimiert. Mittels Western-Blot ließ sich MYB21 nachweisen (Abb. 22A). Dabei war das Protein leicht größer als die zu erwartenden 25 kDa. Die Fusion des Flag-Tags am N- oder C-Terminus zeigte keinen offensichtlichen Einfluss auf die Proteinmenge. MYB14 ließ sich in keinem Ansatz detektieren. Der Nachweis der Genexpression mittels einem *Flag*-spezifischen Primer im transient transformierten Blatt von *N. benthamiana* zeigte sich allerdings als erfolgreich (Abb. 22B). Möglicherweise ist die Proteinmenge nicht groß genug um sie im Western-Blot nachzuweisen. Somit wurde der Versuch der Überexpression beider MYB-TFs in stabil transformierten Pflanzen fortgesetzt.

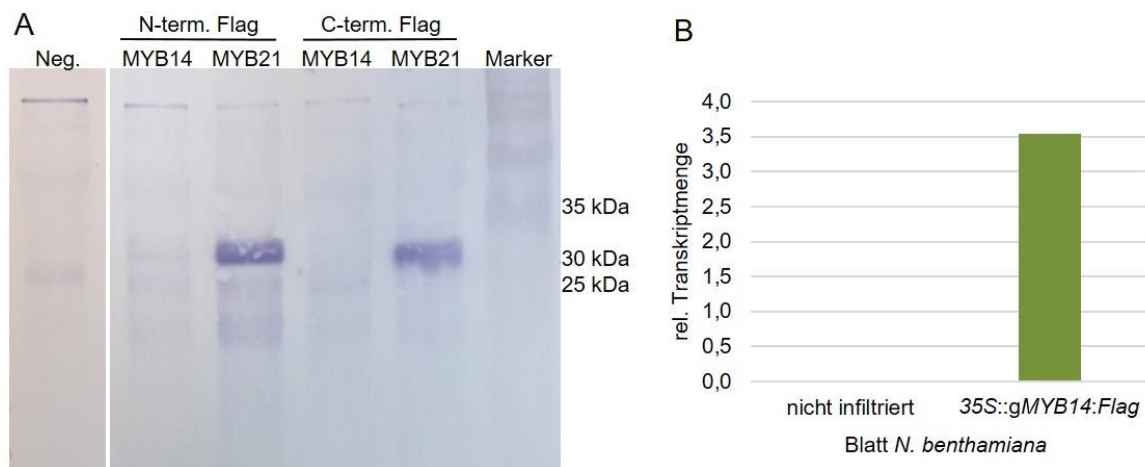


Abb. 22: **transiente Transformation von *N. benthamiana* mit *MYB14* und *MYB21***

A: Gezeigt ist der Western-Blot mit Proteinextrakten aus infiltrierten *N. benthamiana*-Blättern mit Expressionskonstrukten von *Flag* getaggten *gMYB21* bzw. *gMYB14* unter der Kontrolle des 35S-Promoters unter Verwendung des anti-Flag-Antikörpers. Die Negativkontrolle ist Proteinextrakt aus nicht infiltriertem Blatt.

B: Abgebildet ist die relative Transkriptmenge von *MYB14* bezogen auf *NbL23* im transient transformierten Blatt von *N. benthamiana* (genomische Sequenz von *MYB14* mit C-terminalem *Flag*-Tag unter der Kontrolle des 35S-Promoters).

Zunächst wurden Vektoren mit *MYB14* unter der Kontrolle des 35S-Promoters zur Transformation genutzt. Zwölf Primärtransformanten wurden mittels *MYB14*- und *OCS*-Terminator spezifischen Primern auf Vorhandensein des Transgens überprüft, wobei zehn von 12 Pflanzen als transgene Linien identifiziert werden konnten. Eine deutliche Überexpression ließ sich nur in den Blattproben erkennen (Abb. 23). Der 35S-Promoter war nicht im Fruchtblatt der geöffneten Blüte aktiv oder eine post-transkriptionelle Regulierung verhinderte eine Transkriptakkumulation. Aufgrund der Ergebnisse wurden die Experimente nicht bis zum Erhalt der *jai1-1*-homozygoten Linien weitergeführt. Die Transformation mit *35S::gMYB21:Flag* führte zu keinen transgenen Pflanzen.

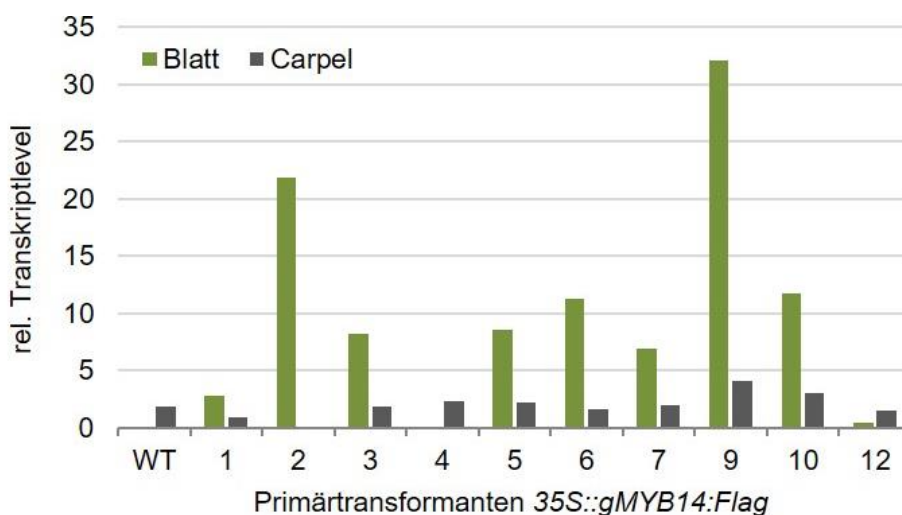


Abb. 23: **MYB14-Expression in *jai1-1* heterozygoten Primärtransformanten**

Die Transformation erfolgte mit der genomischen Sequenz von *MYB14* mit C-terminalem *Flag*-Tag unter der Kontrolle des 35S-Promoters. Die relative Transkriptmenge in Bezug auf *TIP41* wurde in Blatt- und Fruchtblatt-Proben der offenen Blüte bestimmt.

Zur Untersuchung der 35S-Promoter-Aktivität als mögliche Ursache für die fehlende Überexpression, sollten Blüten verschiedener Stadien von 35S::*GUS*-Linien dienen. Diese zeigten eine stärkere GUS-Färbung in der Knospenbasis, den Kelchblättern, Teilen des Griffels und vor allem in den frühen Blütenstadien auch im Fruchtknoten (Abb. 24). Die Färbung des Fruchtknotens mit den Samenanlagen verringerte sich ab Stadium 4 deutlich. Mit zunehmender Entwicklung der reproduktiven Organe nahm die Aktivität des 35S-Promoters demnach in diesen zunehmend ab.

Demnach konnte eine Aktivität des 35S-Promoters im Fruchtblatt nachgewiesen werden. Allerdings entsprach die Kinetik nicht dem Expressionsverlauf der MYB-TFs und es konnte keine deutliche Aktivität in den Samenanlagen gezeigt werden.



Abb. 24: **35S-Promoteraktivität im Blütenstadium 1 bis 5**

GUS-Färbung (6 h) von halbierten Knospen von 35S::*GUS* exprimierenden Pflanzen. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 1 mm.

2.2.4.2.3 Überexpression der genomischen Sequenz von MYB14 und MYB21 unter Kontrolle des *Cel1*-Promoters

Für die vorliegende Arbeit war die Überexpression der MYB-Faktoren in den Samenanlagen mit einer ansteigenden Expression im Verlauf des Knospenwachstums nötig. Unter Beachtung dieser Kriterien sollte ein geeigneter Promoter identifiziert werden. Auf Grundlage der Array-Daten aus dem Vergleich von Transkripten der Samenanlagen zwischen Wildtyp und *jai1-1* (Doktorarbeit Susanne Dobritsch) wurde die *Endo-1,4-β-Glucanase Cel1* ausgewählt. Die Expressionsrate in diesem Stadium lag mit 16400 FPKM in *jai1-1*-Samenanlagen im vergleichbaren Rahmen zu 11500 FPKM für *MYB21* im Wildtyp. Hinzu kam die sehr geringe Expression im Stadium 1, was eine verfrühte *MYB21*-Expression ausschließen sollte. Die 1,5 kb Sequenz *upstream* vom ATG wurde kloniert um damit eine Expression der MYB-TFs im Fruchtblatt zu erreichen. Zunächst wurden Promoter::*GUS*-Linien hergestellt, wodurch acht erfolgreich stabil transformierte Linien auf die *GUS*-Expression in Knospen des Blütenstadiums 4 untersucht werden konnten. Allerdings zeigten sechs von ihnen nur eine sehr schwache *GUS*-Färbung in den Staubblättern, was die dritte Knospe in Abbildung 25 exemplarisch darstellt. Nur zwei Linien zeigten zusätzlich eine Färbung in der Blütenbasis und dem Fruchtknoten, wobei die Samenanlagen jedoch keine *GUS*-Aktivität erkennen ließen (ersten beiden Knospen in Abb. 25).



Abb. 25: ***Cel1*-Promoteraktivität im Blütenstadium 4**

GUS-Färbung (24 h) von halbierten Knospen von drei unabhängigen Linien (Primärtransformanten), die *Cel1*pro::*GUS*:*GFP* exprimierten. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Promoter::*GUS* Linien lassen nicht auf das vollständige Expressionsmuster eines Gens schließen, da regulatorische Elemente innerhalb des Gens fehlen können. Somit wurde die klonierte Sequenz *upstream* des *Cel1*-Gens als Promoter für die Expression der genomischen Sequenzen von *MYB14* und *MYB21* im Fruchtblatt mittels stabiler Transformation genutzt.

Dabei wurden 23 Primärtransformanten im *jai1-1*-heterozygoten Hintergrund aus der Transformation mit *Cel1pro::gMYB14:Flag* mittels PCR überprüft, wovon 17 tatsächlich transgen waren (74 %).

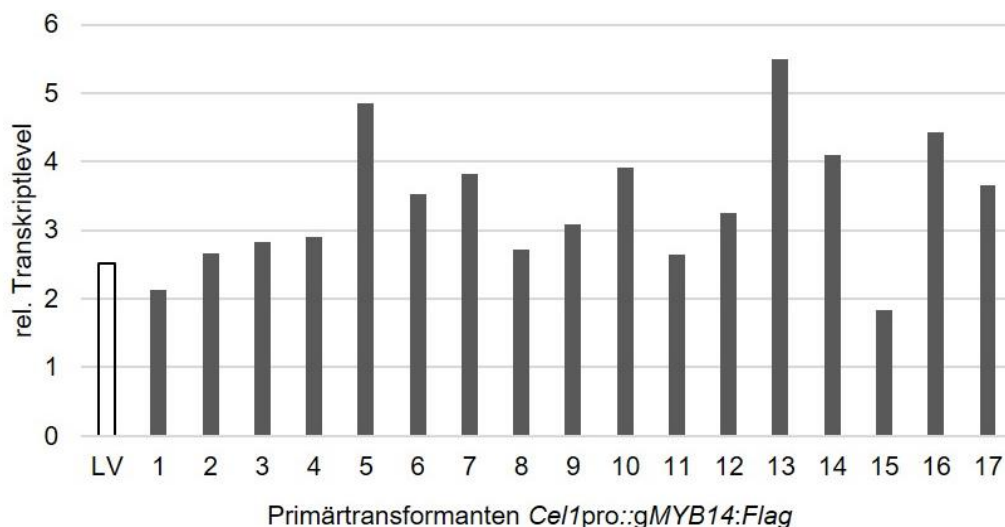


Abb. 26: **MYB14-Expression in *jai1-1* heterozygoten Primärtransformanten**

Die Transformation erfolgte mit der genomischen Sequenz von *MYB14* mit C-terminalem *Flag*-Tag unter der Kontrolle des *Cel1*-Promoters. Die relative Transkriptmenge bezogen auf *TIP41* wurde im Fruchtblatt der offenen Blüte von 17 Primärtransformanten bestimmt. Ein Fruchtblatt einer mit *Cel1pro::GUS:GFP* transformierten *jai1-1* heterozygoten Pflanze diente als Kontrolle (LV = Leervektor).

Für die Expression von *Cel1pro::gMYB21* ließen sich 33 Transformanten generieren, wovon mittels PCR nur in 18 das Transgen nachgewiesen werden konnte (55 %).

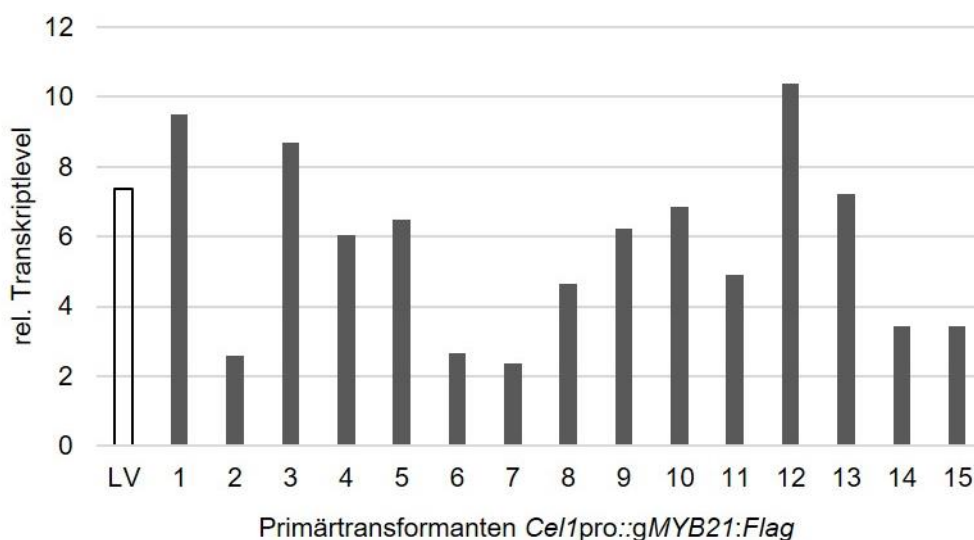


Abb. 27: **MYB21-Expression in *jai1-1* heterozygoten Primärtransformanten**

Die Transformation erfolgte mit der genomischen Sequenz von *MYB21* mit C-terminalem *Flag*-Tag unter der Kontrolle des *Cel1*-Promoters. Die relative Transkriptmenge bezogen auf *TIP41* wurde im Fruchtblatt der offenen Blüte von 15 Primärtransformanten bestimmt. Ein Fruchtblatt einer mit *Cel1pro::GUS:GFP* transformierten *jai1-1* heterozygoten Pflanze diente als Kontrolle (LV = Leervektor).

Laut vorangegangenen Transkriptomanalysen (Doktorarbeit Susanne Dobritzsch) sanken im Wildtyp die Transkriptmengen der beiden MYB-Faktoren in der offenen Blüte (5400 FPKM), wohingegen die Expression von *Cel1* in diesem Stadium hoch blieb bzw. in *jai1-1*-Samenanlagen sogar noch anstieg (16400 FPKM im Wildtyp und 65500 FPKM in *jai1-1*). Aus diesem Grund wurde eine im Vergleich zum Leervektor erhöhte Transkriptmenge von *MYB14* und *MYB21* in der offenen Blüte erwartet. Eine deutliche Überexpression konnte allerdings in keiner der untersuchten Linien nachgewiesen werden (Abb. 26 und 27).

Endgültige Klarheit konnte nur in der Analyse von homozygoten *ja1-1*-Pflanzen gewonnen werden. Allerdings bildeten nicht alle Primärtransformanten Samen (wie Linie 5 und 13 aus der *MYB*-Überexpression), was in der MicroTom generell im Zuge einer stabilen Transformation hin und wieder auftritt. Daher wurden nur je zwei Linien in der nächsten Generation (T_1) genotypisiert und die Transkriptlevel des genomischen *MYB14* bzw. *MYB21* sowie des transgenen Gehaltes an *MYB14*- und *MYB21*-Transkripten (unter Verwendung des *Flag*-Tags) bestimmt.

Dabei konnte für die *MYB14*-Linien nur in einer ausgebrachten Linie homozygote *jai1-1*-Pflanzen detektiert werden. In diesen ließen sich kein endogenes und nur eine sehr geringe Transkriptmenge an transgenem *MYB14* detektieren. In Pflanzen aus der Transformation mit dem Leervektor ließ sich wie zu erwarten nur endogenes *MYB14*-Transkript nachweisen, wobei der Wildtyp eine deutlich höhere Transkriptmenge aufwies als die *jai1-1*-Pflanzen (Abb. 28).

In den transgenen Linien, die *MYB21* überexprimieren sollten, konnte nur wenig Transkript von genomischem *MYB21* detektiert werden und transgen eingebrachtes *MYB21* wurde nicht exprimiert. Auch hier repräsentierte der Leervektor die Menge an genomischem *MYB21*, wobei der Wildtyp erwartungsgemäß eine deutlich höhere Transkriptmenge aufwies als die *jai1-1* Pflanzen (Abb. 28).

Alle *jai1-1*-Linien waren samenlos.

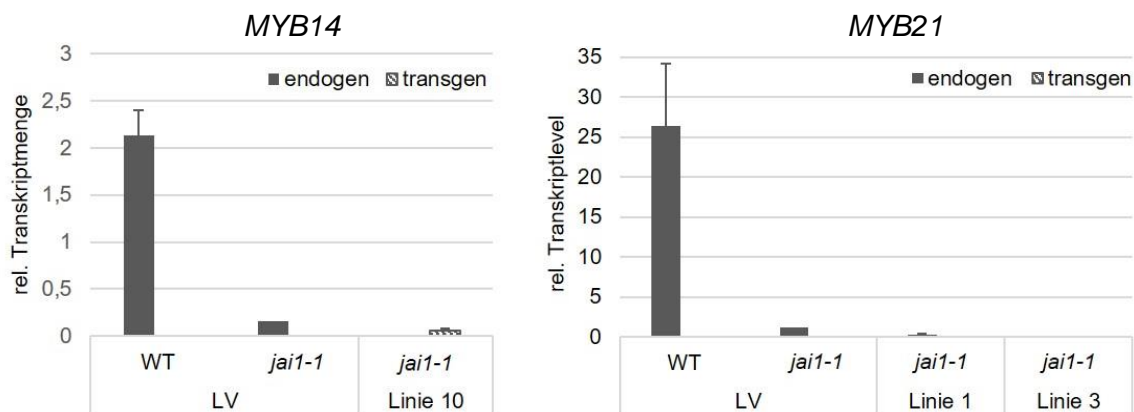


Abb. 28: **Expression von endogenem (rückwärts-Primer in der 3'-UTR) und transgen eingebrachtem MYB14 bzw. MYB21 (rückwärts-Primer im Flag-Tag) in *jai1-1*-Linien**

Die relative Transkriptmenge bezogen auf *TIP41* wurde in Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 der Linie 10 ($n = 4$, \pm Standardfehler) mit *Cel1pro::gMYB14:Flag* sowie der Linien 1 ($n = 4$, \pm Standardfehler) und einer Pflanze der Linie 3 mit *Cel1pro::gMYB21:Flag* bestimmt. Als Vergleich diente der Leervektor LV (*Cel1pro::GUS:GFP*) im Wildtyp- ($n = 3$, \pm Standardfehler) und *jai1-1* Hintergrund ($n = 2$).

Zusammengefasst blieben demnach alle Versuche zur Generierung stabiler *MYB14*- und *MYB21*-Überexpressionslinien im *jai1-1*-Hintergrund erfolglos. Möglicherweise sind wichtige regulatorische Elemente *upstream* oder *downstream* der Gene zur Expression nötig. Ein weiterer Grund könnte eine zum Teil auftretende post-transkriptionelle Stilllegung der Gene aufgrund der Überexpression sein.

2.2.4.3 Komplementation der *A. thaliana myb21-5* mit *SIMYB21*

Es stellte sich die Frage, inwieweit MYB21 aus Tomate interspezifisch konserviert und ein tatsächlich ein funktionales Ortholog des MYB21 in *A. thaliana* ist. Dazu sollte die genomische Sequenz des *MYB21* aus Tomate in der *A. thaliana* Mutante *myb21-5*, die ein Stop-Codon im ersten Exon aufweist (Dr. Jason Reed), exprimiert werden. Hierfür wurde ein Gateway-kompatibler Vektor genutzt, der eine Expressionskassette für das in der Samenschale exprimierte Fusionsgen *OLE1:RFP* zur Selektion der transgenen Samen enthält. Die zweite Expressionskassette wurde mit der genomischen Sequenz des *MYB21* aus Tomate oder *A. thaliana* unter der Kontrolle einer 7,2 kb Sequenz *upstream* vom ATG des *AtMYB21* als Promoter kloniert (Abb. 29). Die transformierten Samen heterozygoter *myb21-5*-Pflanzen wurden durch die rote Fluoreszenz der Samenschale selektiert (Abb. 29) und die heranwachsenden Pflanzen hinsichtlich einer *myb21-5*-Mutation genotypisiert.

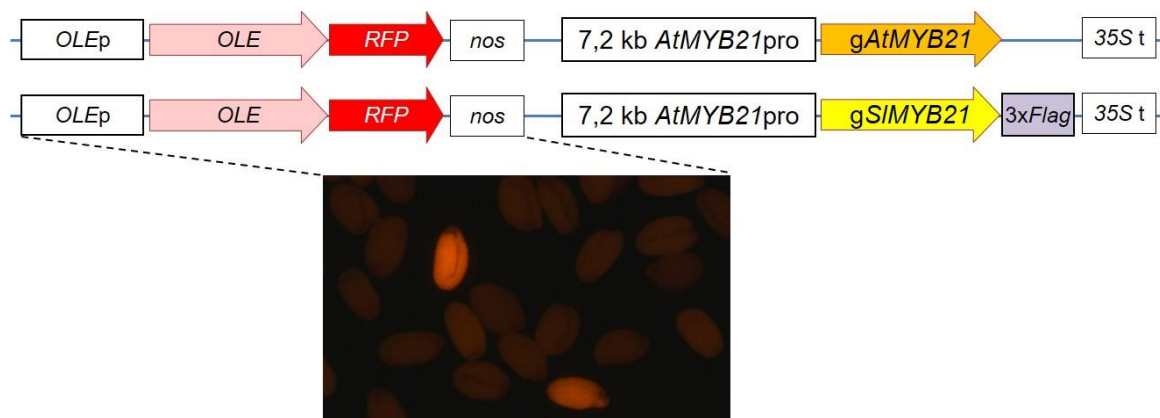


Abb. 29: **Komplementationsversuche von *Atmyb21-5* mit *MYB21***

Die Klonierungsvektoren mit *OLE1*-Expressionskassette und der Expressionseinheit mit der genomischen Sequenz von *MYB21* aus *A. thaliana* (*gAtMYB21*) oder *S. lycopersicum* (*gSIMYB21*) unter Kontrolle des *A. thaliana* *MYB21*-Promoters (*AtMYB21pro*) sind dargestellt. Das Bild zeigt rot fluoreszierenden Samen aufgrund der Expression des *OLE1:RFP*-Fusionsproteins in der Samenschale im Vergleich zu nicht transformierten Samen.

Blüten der *myb21-5*-Mutante weisen kurze, sich kaum öffnende Kronblätter sowie deutlich verkürzte Filamente auf, die unter der Länge der Kelchblätter liegen. Im Gegensatz dazu erreichen im Wildtyp die vier langen Staubblätter die Länge des Fruchtblattes inklusive der Narbe (Abb. 30). Die Schotenbildung bleibt ohne Handbestäubung in der Mutante aus. Für die Transformation mit *MYB21* aus *A. thaliana* wurden acht transgene *myb21-5*-Linien der T₁ analysiert, wobei sechs von ihnen eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps hinsichtlich der Länge und Öffnung der Kronblätter aufwiesen. Hinsichtlich der Filamentlänge zeigten sich variable Phänotypen, wobei drei Linien deutlich längere Filamente als *myb21-5* und vereinzelte Schoten mit Samen bildeten (Abb. 30). Somit konnte bereits für die Komplementation mit dem Art-

eigenen AtMYB21 nur von einer partiellen Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps gesprochen werden, was auch die Arbeit anderer Wissenschaftler bestätigte (Dr. Ivan Acosta, pers. Mitteilung).



Abb. 30: Blütenphänotyp von Wildtyp (WT), *Atmyb21-5* und transgenen *Atmyb21-5*-Pflanzen (*AtMYB21pro::gAtMYB21*)

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von zwei der acht transgenen Linien.

Von der Transformation von heterozygoten *myb21-5*-Pflanzen mit *Flag* getagtem *MYB21* aus Tomate unter der Kontrolle des *A. thaliana* *MYB21*-Promoters wurden acht transgene, homozygote *myb21-5* Linien handbestäubt und die T₂-Samen hinsichtlich dem Verhältnis an fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Samen zur Abschätzung der Kopienzahl des Transgens untersucht. Dabei waren in fünf Linien dreiviertel der Samen fluoreszierend und segregierten damit laut der Erwartung für eine einzige Kopie im Genom. Mit diesem Indiz zur Beinhaltung einer Kopie des Transgens wurde der Blütenphänotyp dieser fünf Linien näher analysiert. Dabei zeigten alle Linien in der Mehrzahl der Blüten die Komplementation zum Wildtyp hinsichtlich der Blütenöffnung (Abb. 31 links). Die Filamentlängen waren hingegen sehr variabel, auch innerhalb einer Linie. Die meisten Pflanzen bildeten leicht längere Filamente als *myb21-5*, die jedoch nicht zur Selbstbestäubung ausreichten (Abb. 31). Zwei und eine von zehn Pflanzen der Linie 9 und 12 bildeten jedoch lange Filamente, die die Narbe erreichten und eine Vielzahl von Schoten mit Samen vergleichbar zum Wildtyp produzierten. Möglicherweise wurde die Komplementation aufgrund eines Dosiseffektes erreicht und diese Pflanzen waren homozygot für das Transgen. Somit ließ sich vergleichbar mit der Expression des *MYB21* aus *A. thaliana* eine partielle Komplementation zum Wildtyp mit *MYB21* aus Tomate erreichen. Es handelt sich um zueinander orthologe TFs.

Ein Vergleich der Linien hinsichtlich der Menge an gebildetem *MYB21*-Protein durch Western-Blot-Analysen unter Anwendung des *Flag*-Tags war leider nicht möglich, da in keiner der Linien das Protein nachgewiesen werden konnte. Daher ist dies wahrscheinlich nicht auf das Fehlen des Fusionsproteins zurückzuführen. Stattdessen

wurde wahrscheinlich eine zu geringe Menge an geschlossenen Knospen zur Proteinextraktion eingesetzt.



Abb. 31: Blütenphänotyp von transgenen *myb21-5*-Pflanzen (*AtMYB21pro::gSIMYB21:Flag*) Gezeigt sind eine für alle Linien repräsentative Infloreszenz (links) und repräsentative Aufnahmen einzelner Blüten der fünf analysierten Linien (von jeweils zehn Pflanzen pro Linie).

2.2.4.4 Loss-of-Function-Linien von MYB14 und MYB21 im Wildtyp-Hintergrund

Vor allem aufgrund der fehlenden funktionellen Analyse der MYB-Faktoren durch eine Überexpression in der *jai1-1*-Mutante war die Untersuchung von *loss-of-function*-Linien im Wildtyp besonders wichtig. Zunächst sollten TILLING-Linien untersucht werden, die jeweils einen Basenpaaraustausch in der genomischen Sequenz der MYB-Faktoren aufwiesen.

2.2.4.4.1 Charakterisierungen von MYB14-TILLING-Linien

Durch einen Screen der MicroTom-TILLING-Population (Okabe et al., 2011) wurden zwei Linien zur Verfügung gestellt, deren Punktmutation jeweils in einem Exon von *MYB14* stattfand und einen Aminosäureaustausch zur Folge hatten. Die Abbildung 32 zeigt einen Ausschnitt eines Aminosäurealignments von MYB14-Homologen unterschiedlichster Pflanzenarten, wie beispielsweise weiteren Solanaceae, *A. thaliana*, zwei Baumarten sowie einigen Monokotyledonen. An erster Stelle steht MYB14 aus Tomate und die gelben Kästchen zeigen die jeweilige Position der Mutation in den TILLING-Linien. Dabei lässt sich auch erkennen, dass die Mutation der zweiten Linie außerhalb der MYB-Domänen lag und in beiden Fällen keine hoch konservierte Aminosäure betroffen war.

Der Blütenphänotyp ließ keine Veränderungen zum Wildtyp erkennen und die Früchte enthielten Samen. Somit scheint entweder MYB14 allein keine essentielle Rolle in der Blüten- und Samenentwicklung zu spielen oder die Mutationen führten zu keinen Beeinträchtigungen der Funktion von MYB14. Eine weitere Möglichkeit ist die Redundanz mit einem anderen MYB-TF.



Abb. 32: Ausschnitt eines Aminosäurealignments von SIMYB14

Das Alignment wurde mit SIMYB14-Homologen aus weiteren Solanaceae und anderen Arten einschließlich einiger Monokotyledonen durchgeführt. Oberhalb in grün ist die Annotation einer der MYB-Domänen sowie durch die gelben Kästchen die Position der Aminosäuremutation der beiden TILLING-Linien (*W3551* und *W2998* außerhalb der MYB-Domänen) dargestellt.

2.2.4.4.2 Charakterisierungen von MYB21-TILLING-Linien

Für *MYB21* wurden sieben Linien aus der TILLING-Population identifiziert (Okabe et al., 2011), wovon fünf einen Aminosäureaustausch im ersten oder zweiten Exon aufwiesen. Die Abbildung 33 zeigt ein Aminosäurealignment mit Teilen der beiden MYB-Domänen von MYB21-Proteinen unterschiedlichster Pflanzenarten. An erster Stelle ist die Aminosäuresequenz des MYB21 von *S. lycopersicum* zu sehen und die gelben Kästchen zeigen die Positionen der in den TILLING Linien veränderten Aminosäuren an: Von rechts nach links Linie 7979, 469, 7564 (keine Keimung), 8945 in der ersten und Linie 8245 in der zweiten MYB-Domäne. Dabei wird deutlich, dass nur die Linien 469 mit einem Austausch von Leucin zu Lysin und 8945, in der anstelle des Tryptophans ein Stopp-Codon entsteht, eine Mutation von hoch konservierten Aminosäuren aufwiesen. Von Linie 8945 war kein Samen-Stock verfügbar.

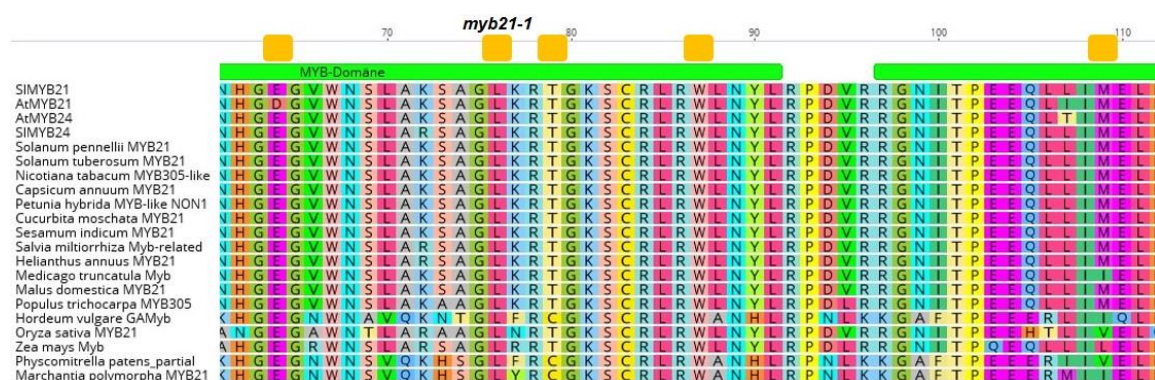


Abb. 33: Ausschnitt eines Aminosäurealignments von SIMYB21

Das Alignment wurde mit Homologen aus weiteren Solanaceaeen und anderen Arten einschließlich einiger Monokotyledonen durchgeführt. Oberhalb in grün ist die Annotation der beiden MYB-Domänen sowie durch die gelben Kästchen die Positionen der Mutationen der TILLING-Linien dargestellt. Besonders zu beachten ist Linie 469 (*myb21-1*), die eine Mutation eines konservierten Leucins betrifft.

Von den zur Verfügung stehenden Linien zeigte Linie 469 (folgend als *myb21-1* bezeichnet) als einzige der untersuchten Linien einen zum Wildtyp veränderten Blütenphänotyp. Ab dem Blütenstadium 3 verzögerte sich die Entwicklung, die Kronblätter öffneten sich langsamer, „gewellt“ und meist nur unvollständig (Abb. 34B). In der Regel folgte nur eine Blütenseneszenz ohne Fruchtbildung. In einigen wenigen Fällen bildeten sich verspätet einige kleine Früchte, die wenige Samen enthielten (Abb. 34C).



Abb. 34: **Blüten und Früchte von *myb21-1* im Vergleich zum Wildtyp**

A und B: Gezeigt sind Infloreszenzen des (A) Wildtyps und (B) *myb21-1*. Ab dem Blütenstadium 3 verzögerte sich die Entwicklung in *myb21-1*, wobei die vollständige Blütenöffnung mit nach hinten gespannten Kronblättern ausblieb.

C und D: Gezeigt sind Früchte von (C) *myb21-1* vier Monate nach Blüte und (D) Wildtyp. *myb21-1* bildete nur vereinzelt, deutlich kleinere Früchte als der Wildtyp, die nur wenige Samen enthielten.

Aufgrund der samenlosen Früchte wurde die Morphologie der Samenanlagen hinsichtlich der Beschaffenheit des Nucellus' sowie der Integumente anhand von gefärbten Semidünnschnitten betrachtet (Abb. 35). Dabei wurde deutlich, dass die prinzipielle Entwicklung von der Knospe bis zur geöffneten Blüte in der Mutante vergleichbar zum Wildtyp verlief. Über die gesamte Entwicklung hindurch zeigte sich eine starke Färbung der inneren Zellschicht des Nucellus', was auf sehr dichtes Cytoplasma in den Zellen hinweist. Ab dem Blütenstadium 4 ließen sich in *myb21-1* jedoch deutliche Unterschiede durch das verstärkte Auftreten stark vakuolisierter Zellen erkennen, die die geordnete Zellanordnung im Nucellus durchbrachen (Pfeile). Dieses Merkmal ist ein Zeichen für die Initiierung von programmiertem Zelltod, welcher im Nucellus erst mit der Befruchtung auftreten sollte (Xu et al., 2016). Die Vakuolisierung ließ sich nicht in allen betrachteten Samenanlagen in gleich hohem Ausmaß feststellen, was durch die Abbildungen von zwei Proben pro Stadium exemplarisch dargestellt ist (Abb. 35B und C). Die Mehrheit der untersuchten Samenanlagen wies jedoch die besagte Fehlentwicklung auf, woraus auf eine Fehlreifung der überwiegenden Anzahl der Samenanlagen in der Mutante geschlossen werden kann.

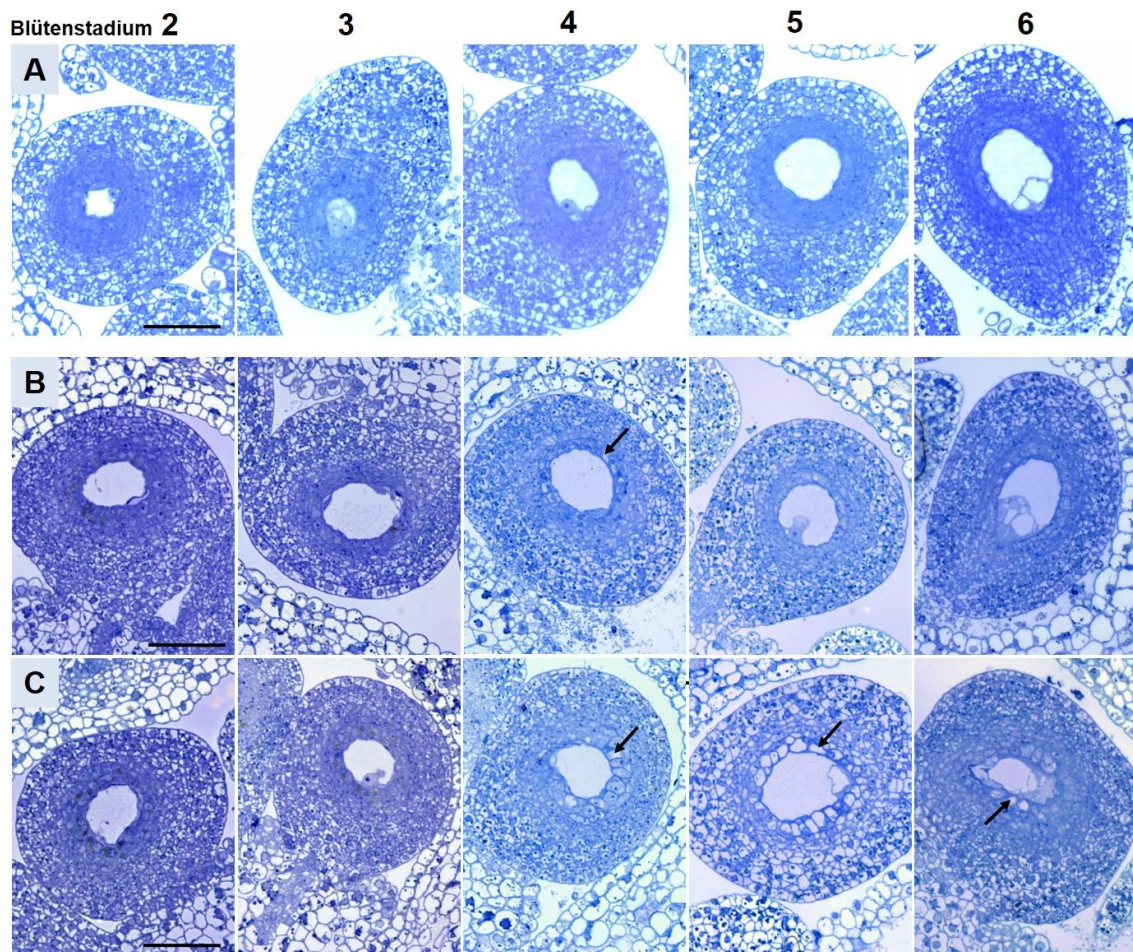


Abb. 35: **Toluidin-blau gefärbte Semidünnschnitte von Samenanlagen der Stadien 2 bis 6** (A) WT, (B) und (C) *myb21-1*. Die Maßstäbe entsprechen 50 μm .

Es stellte sich nun die Frage, ob die offensichtliche Funktionseinschränkung des MYB21 in der *myb21-1*-Mutante bereits auf eine Fehlregulierung seiner Transkription zurückzuführen war. Die Analyse der Transkriptmengen zeigte allerdings keine signifikanten Unterschiede in den Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 der *myb21-1* im Vergleich zum Wildtyp im TILLING-Hintergrund (Abb. 36). Somit schien keine transkriptionelle Rückkopplung des mutierten *MYB21* vorzuliegen.

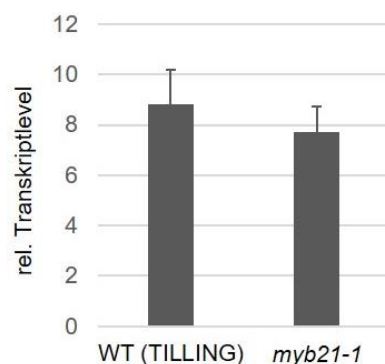


Abb. 36: **MYB21-Expression in Wildtyp im TILLING-Hintergrund und *myb21-1***
Die relative Transkriptmenge bezogen auf *TIP41* wurde in Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 bestimmt (n = 3, \pm Standardfehler).

Um einen putativen Zusammenhang zwischen der MYB21-Aktivität und den JA-Gehalten zu untersuchen, wurden die Gehalte an OPDA, JA und JA-Ile in den Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 bestimmt. Die Messungen zeigten sehr geringe Gehalte an OPDA in allen Genotypen und wie zu erwarten an JA und JA-Ile in der *jai1-1*-Mutante (Abb. 37 links). Überraschenderweise fanden sich zudem im Vergleich zum Wildtyp halbierte Level an JA und JA-Ile in *myb21-1*. Die gleichen Verhältnisse ließen sich in den Staubblättern nachweisen (Abb. 37 rechts), wo *MYB21* ebenfalls exprimiert wird (Doktorarbeit Susanne Dobritsch). Somit lässt sich eine positive Rückkopplung von *MYB21* auf die JA-Biosynthese in beiden Blütenorganen vermuten. Im Fruchtblatt wurden deutlich geringere Gehalte an der biologisch aktiven Form JA-Ile im Vergleich zu JA gemessen, was im Staubblatt der entgegengesetzte Fall war (Abb. 37).

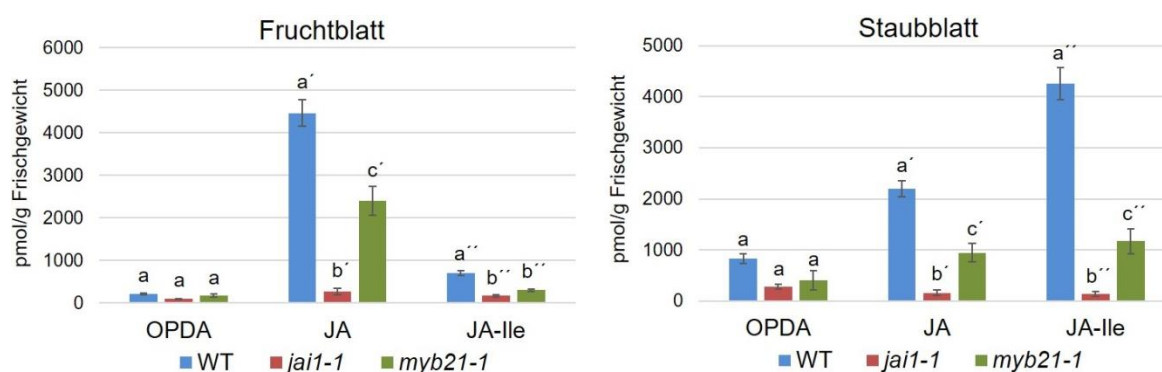


Abb. 37: **Gehalte an OPDA, JA und JA-Ile in Frucht- und Staubblättern des Stadiums 3**
Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp (WT), *jai1-1* und *myb21-1* wurden mittels 1-faktorieller ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test ermittelt ($p \leq 0,05$) und sind durch unterschiedliche Buchstaben dargestellt ($n = 4 - 6$, \pm Standardfehler).

2.2.4.4.3 Herstellung und Charakterisierung von MYB14-Mutanten mittels CRISPR/Cas9

Aufgrund der zahlreichen, unbekanntem Hintergrundmutationen in den TILLING-Linien war die Herstellung von unabhängigen Mutanten unabdingbar, um die biologische Funktion der MYB-Faktoren zu bestätigen. Dazu wurde das CRISPR/Cas9-System genutzt, um gezielt Mutationen in der genomischen Sequenz von *MYB14* und *MYB21* hervorzurufen.

Für den *loss-of-function* von *MYB14* wurde ein Klonierungsvektor erstellt, der zwei *guide*-RNAs enthielt, die an Sequenzen im ersten Exon binden (Abb. 38).

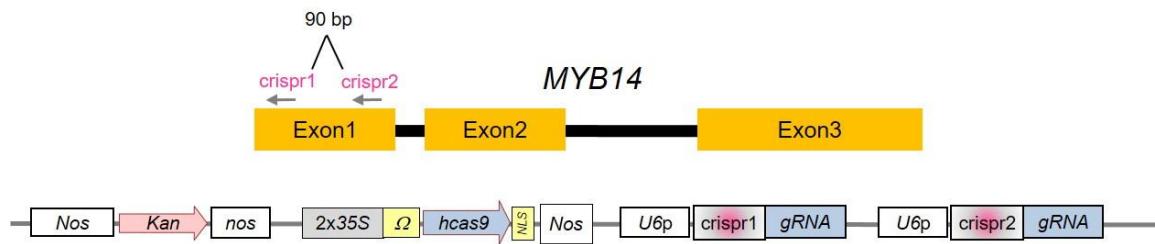


Abb. 38: **Schematische Darstellung von MYB14 und CRISPR/Cas9-Klonierungsvektor**
 Die Exons und Position der Zielsequenzen für die CRISPR-RNAs (crispr1 und 2) sind dargestellt. Darunter sind die wichtigsten Elemente des Klonierungsvektors gezeigt: die Kanamycin (*Kan*)-Resistenzkassette, der Expressionseinheit mit 35S-Promoter und der für den Mensch optimierten Cas9 (*hcas9*) ohne Introns mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie den zwei Modulen mit jeweils einer CRISPR-RNA und dem zweiten universellen Teil der guide-RNA (gRNA), kontrolliert durch einen *A. thaliana* Konsens-Promoter der U6-Familie (U6p).

Nach der Transformation überlebten fünf Primärtransformanten, die alle Mutationen in der Zielsequenz aufwiesen (Abb. 39). Dabei zeigten Linie 1 und 4 Heterozygotie, wobei beide Allele wahrscheinlich unterschiedlich mutiert waren. Linie 2 wies eine Deletion zwischen den beiden Erkennungssequenzen der guide-RNAs und wahrscheinlich eine zusätzliche heterozygote Mutation auf. Nur die Linie 5 ließ homozygote Mutationen erkennen, sowohl in der Zielsequenz 1 durch eine Thymin-Insertion als auch in der Zielsequenz 2 durch eine Thymin-Deletion (Pfeile, Abb. 39). Die erste Mutation führte bereits zur Verschiebung des Leserahmens mit der Bildung eines Stopp-Codons anstelle des übernächsten Aminosäure-Codons.

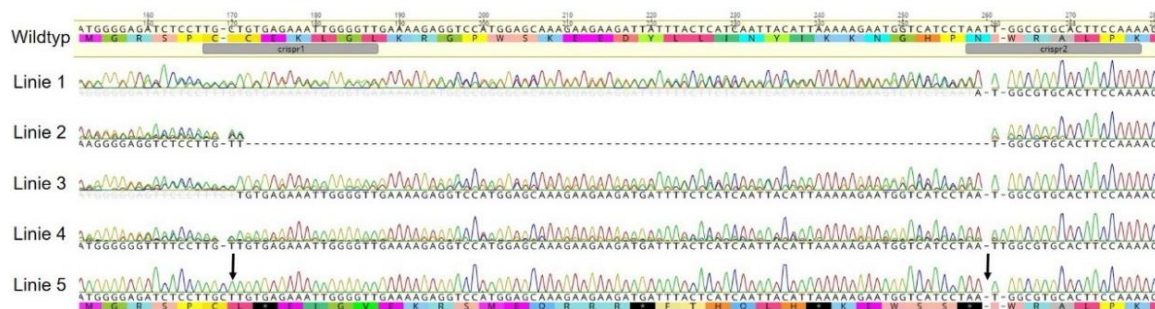


Abb. 39: **Ausschnitt der Sequenzierung des ersten MYB14-Exons der CRISPR/Cas9-Linien**
 Oben sind die Basen- und Aminosäuresequenz der Wildtyp-Sequenz mit der Annotation der CRISPR-RNA-Erkennungssequenzen (grau) dargestellt. Zu beachten sind die Doppelpeaks und somit unterschiedlichen Basensequenzen der beiden Allele in den Linien 1 bis 4 sowie die homozygote Verschiebung des Leserahmens (Pfeile) in der Linie 5.

Keine der fünf Primärtransformanten zeigte einen offensichtlichen Blütenphänotyp. Jedoch bildeten Linie 1 und 2 kaum und Linie 5 keine Samen. Auch die Nutzung der Pollen zur Handbestäubung des Wildtyps konnte keine Samenbildung erzielen, was auf Defekte in der Pollenentwicklung hinweisen könnte. Allerdings bildeten auch mitgeführte Transformanten, die den Leervektor trugen kaum Samen, weshalb der Phänotyp wahrscheinlich nicht auf eine Mutation von MYB14, aber auf der vereinzelt auftretenden

parthenokarpen Eigenschaft von MicroTom-Tomaten innerhalb einer stabilen Transformation beruht.

Die Analyse, ob die Expression von *MYB14* in den Mutantenlinien beeinträchtigt war, zeigte keine nennenswerten Unterschiede in der relativen Transkriptmenge im Vergleich zum Leervektor in den Linien 1 bis 3 (Abb. 40). Linie 4 wies geringere Transkriptlevel auf, was allerdings in der T_1 mittels der Untersuchung mehrerer Pflanzen bestätigt werden müsste. Aufgrund von experimentellen Problemen bei der cDNA-Synthese konnte Linie 5 nicht analysiert werden.

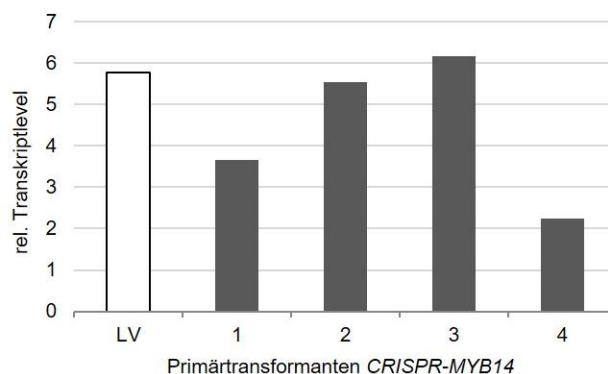


Abb. 40: ***MYB14*-Expression in CRISPR/Cas9-Primärtransformanten**

Die relative Transkriptmenge bezogen auf *TIP41* wurde in Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 von vier Primärtransformanten des CRISPR/Cas9-Konstruktes im Vergleich zu einer mit dem Leervektor (LV) transformierten Pflanze bestimmt.

2.2.4.4 Herstellung und Charakterisierung von *MYB21*-Mutanten mittels CRISPR/Cas9

Für die Erstellung von *MYB21*-*loss-of-function*-Mutanten wurden zwei Expressionsvektoren erstellt, welche eine *guide*-RNA, die an eine spezifische Sequenz im ersten Exon bzw. zwei *guide*-RNAs, die im zweiten Exon binden, enthielten (Abb. 41).

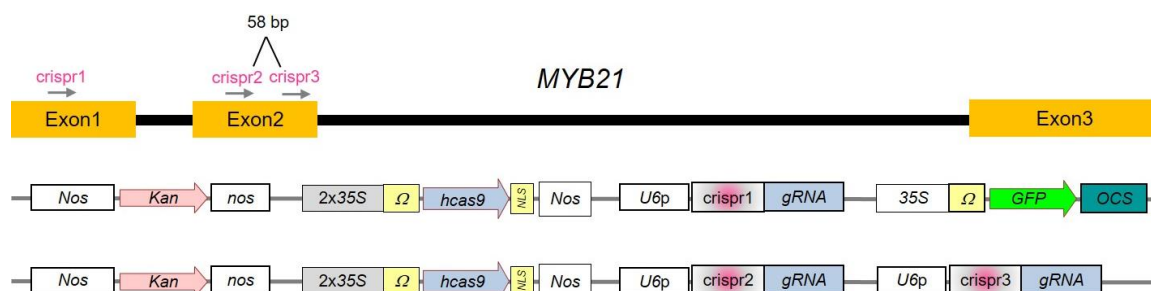


Abb. 41: **Schematische Darstellung von *MYB21* und CRISPR/Cas9-Klonierungsvektor**

Die Exons und Positionen der Zielsequenzen für die CRISPR-RNAs (crispr1 bis 3) sind dargestellt. Darunter sind die beiden Klonierungsvektoren gezeigt: die Kanamycin (*Kan*)-Resistenzkassette, die Expressionseinheit mit 35S-Promoter und der für den Mensch optimierten Cas9 (*hcas9*) ohne Introns mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie einem oder zwei Modulen mit jeweils einer CRISPR-RNA und dem zweiten universellen Teil der *guide*-RNA (gRNA), kontrolliert durch einen *A. thaliana* Konsens-Promoter der *U6*-Familie (*U6p*). Der erste Vektor enthielt nur eine *guide*-RNA, die an eine Sequenz im ersten Exon bindet sowie eine *GFP*-Expressionseinheit unter dem 35S-Promoter.

Die Transformation des Wildtyps mit beiden Konstrukten führte zu insgesamt 36 Primärtransformanten, in denen sich ein Cas9-PCR-Produkt nachweisen ließ. 29 von ihnen wiesen durch die Analyse einer einzelnen Blattprobe eine Mutation im ersten bzw. zweiten *MYB21*-Exon auf und 25 von ihnen waren samenlos. Trotz der zuvor genannten vereinzelt auftretenden Parthenokarpie bei der stabilen Transformation von MicroTom war der besagte Umfang der Sterilität ein starkes Indiz für eine Rolle von *MYB21* bei der Samenbildung. Die vier Linien mit wenigen Samen (alle *crispr1*) sowie sieben, die die Cas9, aber keine Mutation enthielten und Samen bildeten, wurden in die nächste Generation gebracht und erneut auf Mutationen in *MYB21* geprüft. Dabei wiesen die Nachkommen von drei Linien Mutationen auf: zwei Linien mit der *crispr1*-Zielsequenz, die bereits in der T_0 mutiert waren sowie eine Linie mit den Zielsequenzen im zweiten Exon. Letztere zeigte in der T_0 keine Mutation in dem getesteten Blatt, bildete aber nur wenige Samen, was auf eine chimäre Pflanze hinwies. Die beiden Linien mit der Zielsequenz im ersten Exon wiesen sowohl homozygote als auch heterozygote Mutationen auf und bildeten keine Früchte oder Samen. Die Linie mit den Erkennungssequenzen im zweiten Exon von *MYB21* brachte heterozygote Pflanzen mit einem Wildtyp-Allel und einem mutierten Allel mit einer Thymin-Deletion oder Thymin-Insertion hervor, die phänotypisch keine Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen und Samen bildeten. In der T_2 erfolgte die erwartete Segregation in Wildtyp-, heterozygote und homozygote Pflanzen. Sowohl die Thymin-Deletion (*myb21-2*) als auch die Thymin-Insertion (*myb21-3*) führten zur Bildung eines Stopp-Codons noch innerhalb der zweiten MYB-Domäne (Abb. 42).

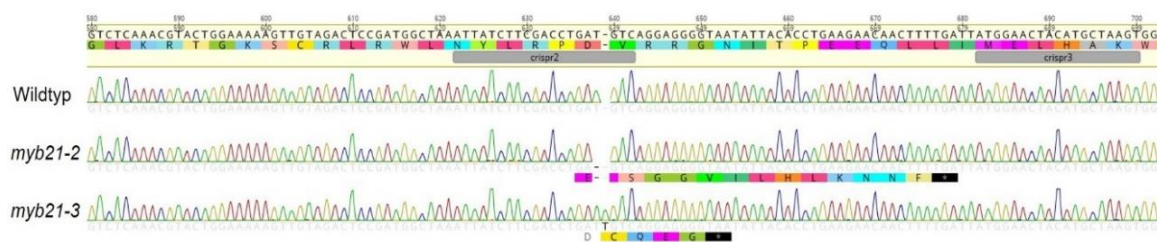


Abb. 42: **Ausschnitt der Sequenzierung des zweiten *MYB21*-Exons aus genomischer DNA des Wildtyps, *myb21-2* und *myb21-3***

myb21-2 weist eine Thymin-Deletion und *myb21-3* eine Thymin-Insertion auf. Unter der Basensequenz ist jeweils die daraus resultierende veränderte Aminosäuresequenz gezeigt. Oben sind die Basen- und Aminosäuresequenz des zweiten Exons von *MYB21* mit den in grau markierten CRISPR-RNA-Zielsequenzen (*crispr2* und *3*) dargestellt. Die Abbildung ist aus Schubert et al. (2019) entnommen.

Die beiden homozygoten Mutationen wirkten sich bis zum Beginn der Bildung der Infloreszenzen nicht auf die Entwicklung der Pflanze aus. Diese setzte jedoch leicht verspätet zum Wildtyp ein und beginnend mit dem Blütenstadium 3 kam es zu auffälligen

Veränderungen. Die Knospen waren größer (Anhang Abb. 1) und verharnten mehrere Tage in diesem Stadium. Schließlich wellten und färbten sich die Kronblätter gelb. Sie öffneten sich nur leicht an der Spitze und verharnten erneut mehrere Tage in diesem Stadium. Die vollständige Öffnung der Blüte erfolgte schließlich nur aufgrund des beginnenden Wachstums des Fruchtknotens, wobei die vollständige Spreizung der Kronblätter nach hinten sowie die Seneszenz der verwachsenen Antherenkronen ausblieben. Die Fruchtbildung setzte mit noch das Fruchtblatt umspannenden gelben Antheren ein. Am Ende der Fruchtreifung fielen vermehrt größere, unförmige Früchte auf, wobei alle Früchte ausnahmslos samenlos waren (Abb. 43).



Abb. 43: **Defekte in der Blütenöffnung und samenlose Früchte in *myb21-2* und *myb21-3***
Gezeigt sind eine sich öffnende, eine offene Blüte, eine Infloreszenz mit beginnender Fruchtbildung sowie eine samenlose Frucht (von links nach rechts) von (A) *myb21-2* und (B) *myb21-3*.

Die Analyse der Pollenvitalität zeigte die Bildung von überwiegend lebenden Pollen in *myb21-2*, die ähnlich dem Wildtyp war (Abb. 44A und B). Die Pollenkeimung war allerdings stark reduziert und vergleichbar mit *jai1-1*-Pollen (Abb. 44C bis E). Die Verwendung der *myb21-2*- Pollen zur Bestäubung des Wildtyps führte jedoch zur erfolgreichen Samenbildung, was eine zur Befruchtung ausreichende Fertilität der Pollen zeigte.

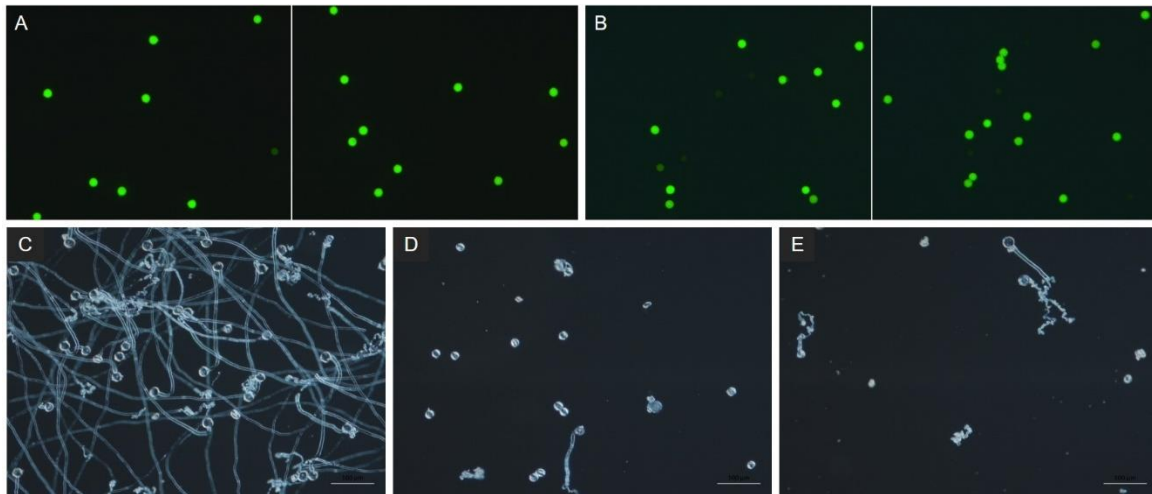


Abb. 44: **Pollenvitalität und Pollenkeimung in *myb21-2***

A und B: Die Vitalität der Pollen der geöffneten Blüten in (A) Wildtyp und (B) *myb21-2* wurde mittels FDA-Färbung untersucht. Grüne Fluoreszenz symbolisiert lebende Zellen aufgrund ihrer Kapazität FDA in Fluorescein zu spalten. Exemplarisch sind Pollen von jeweils zwei Pflanzen gezeigt.

C bis E: Gezeigt ist die *in vitro*-Keimung von Pollen der geöffneten Blüten von (C) Wildtyp, (D) *myb21-2* und (E) *jai1-1*. Der Maßstab entspricht 100 µm.

Die Selbstung per Handbestäubung im Blütenstadium 4 oder 6 mit Pollen aus geöffneten Blüten von *myb21-2* und *myb21-3* führte allerdings zur Bildung einiger Samen, was die Intaktheit einiger Samenanlagen bewies. Tatsächlich zeigten Toluidin-blau gefärbte Semidünnschnitte noch intakte Zellen in der inneren Nucellusschicht im Stadium 4 (Abb. 45). In der geöffneten Blüte befanden sich überwiegend stark vakuolisierten Zellen des Nucellus', wodurch möglicherweise im Großteil der Samenanlagen keine Befruchtung stattfinden konnte. Somit ließ sich die Samenbildung durch Handbestäubung evtl. durch eine frühere Bestäubung als unter natürlichen Bedingungen und mit Pollen aus späteren Blütenstadien erreichen, welche vor allem aufgrund der abnormalen Blütenöffnung auf natürlichem Wege nicht erfolgen könnte.

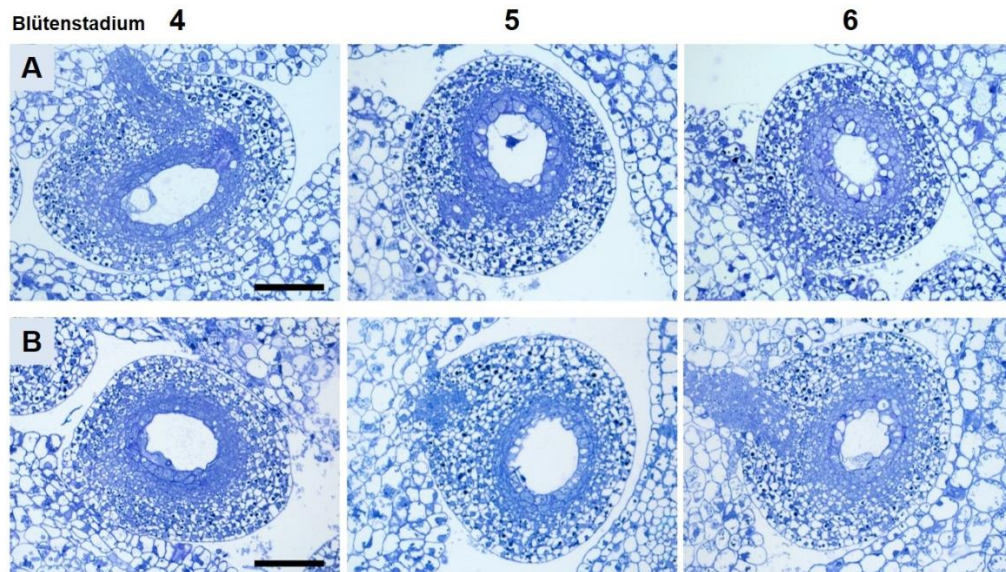


Abb. 45: **Toluidin-blau gefärbte Semidünnschnitte von Samenanlagen der Stadien 4 bis 6** (A) *myb21-2* und (B) *myb21-3*. Die Maßstäbe entsprechen 50 μm .

Die Frage, ob in *myb21-2* und *myb21-3* die Parthenokarpie abhängig von einer erfolgten Befruchtung ausgelöst wird, sollte mit Emaskulationsexperimenten untersucht werden. Der Wildtyp bildete dabei ohne die Möglichkeit der Befruchtung keine Früchte (Untersuchung von 22 Knospen). Das Entfernen des Staubblattes von 26 und 13 Knospen der *myb21-2* im Stadium 3 und 4 führte zu einer unvollständigen Parthenokarpie mit der Bildung von 4 und 7 samenlosen Früchten. Die Emaskulation von 22 Knospen im Blütenstadium 4 in der *jai1-1*-Mutante brachte zehn verspätete, extrem kleine Früchte hervor. Der Verlust der kompletten JA-Signalwirkung hatte demnach andere Auswirkungen als nur das Fehlen der MYB21-Aktivität. Die Ergebnisse konnten nicht eindeutig klären, ob eine Befruchtung in den Mutanten stattfand. Prinzipiell war die Bildung samenloser Früchte in *myb21-2* ohne Befruchtung möglich. Sie fand allerdings nur in geringem Ausmaß statt, wobei es aber auch möglich ist, dass allein das Fehlen der männlichen Blütenorgane die Fruchtbildung zum Teil unterdrückte. Die Bildung von Früchten in für MicroTom üblicher Größe scheint in *jai1-1*-Pflanzen von einer erfolgten Befruchtung abhängig zu sein. Dies und der von Goetz et al. (2012) erbrachte Nachweis eines unvollständig entwickelten Embryos in *jai1-1*-Samenansätzen zwei Wochen nach Bestäubung lässt auf eine i.d.R. erfolgte Befruchtung in der *jai1-1*-Mutante schließen.

Die Unterschiede zwischen der *jai1-1*- und den *myb21*-Mutanten im Hinblick auf die Vorgänge innerhalb der Blütenöffnung und Befruchtung könnten durch MYB21-unabhängige JA-Funktionen erklärt werden. Dazu sollten zunächst die JA-Gehalte im Fruchtblatt untersucht werden. Dabei zeigte sich ähnlich wie in *myb21-1*, dass die Fruchtblätter der *myb21-2* und *myb21-3* zum Wildtyp um die Hälfte reduzierte Gehalte

an JA und JA-Ile enthielten (Abb. 46). Das deutet erneut darauf hin, dass MYB21 durch eine positive Rückkopplung die JA-Biosynthese beeinflusst. Dies war ebenso der Fall in den Staubblättern des Blütenstadiums 3, wobei zusätzlich signifikant erhöhte OPDA-Level in beiden Mutanten auffielen. Der JA-Vorläufer akkumulierte möglicherweise aufgrund eines geringeren Umsatzes zu JA.

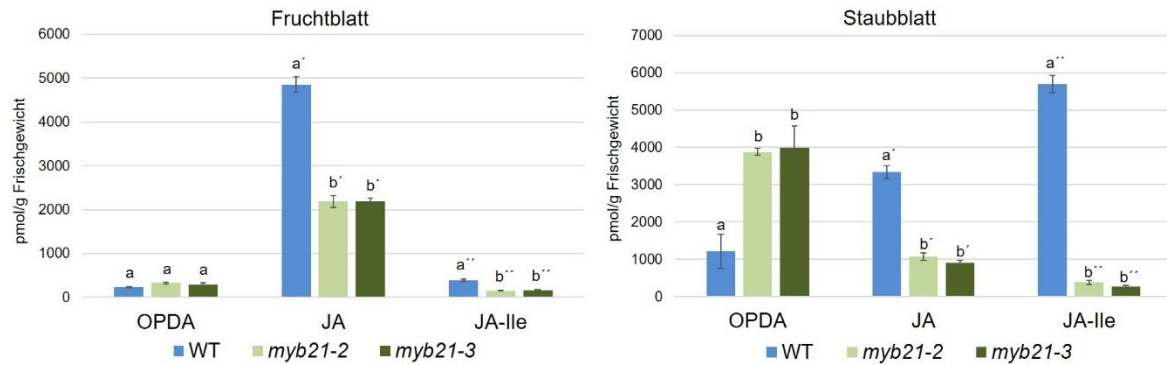


Abb. 46: **Gehalte an OPDA, JA und JA-Ile in Frucht- und Staubblättern des Stadiums 3**
 Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp (WT), *myb21-2* und *myb21-3* wurden mittels 1-faktorieller ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test ermittelt ($p \leq 0,05$) und sind durch unterschiedliche Buchstaben dargestellt ($n = 5$, \pm Standardfehler).

Aufgrund der erfolgreichen Generierung homozygoter MYB21-*loss-of-function*-Linien mit einem zum Wildtyp veränderten Blütenphänotyp und dem Verlust der Samenbildung, wurde sich im folgenden Verlauf der Arbeit nur auf MYB21 konzentriert.

2.2.4.5 Komplementation der *S. lycopersicum myb21-2* mit *SIMYB21*

Die Komplementation der *myb21-2* mit der genomischen Wildtyp-Sequenz unter der Kontrolle des eigenen Promoters sollte die Kausalität der Mutation von *MYB21* an der Regulierung der veränderten phänotypischen Merkmale bestätigen.

Zunächst wurden neun stabile Promoter-*GUS*-Linien mit der 1,5 kb Region *upstream* des *MYB21*-Translationsstartes erstellt. Drei von ihnen wurden in der T₁ mittels *GUS*-Färbung halbiertes Knospen im Blütenstadium 4, in dem das Expressionsmaximum von *MYB21* lag, analysiert. Dabei ließ sich allerdings nur eine Färbung der Antheren sowie in zwei der Linien eine Färbung der Knospenbasis und punktuell im Griffel oder Fruchtknoten erkennen (Abb. 47). Ein Nachweis der *GUS*-Aktivität in den Samenanlagen blieb aus.

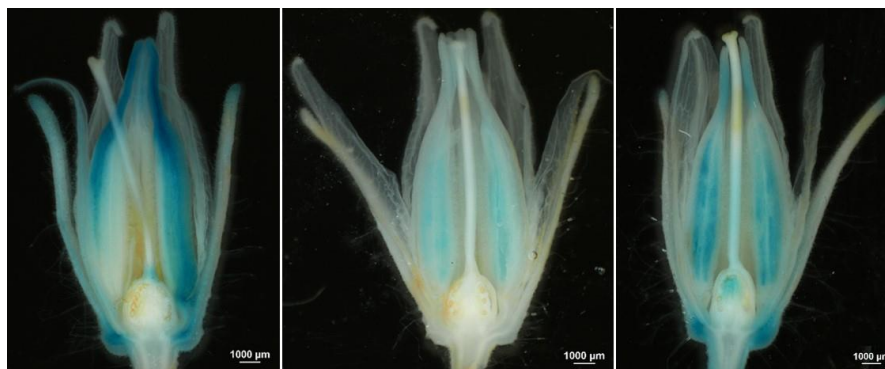


Abb. 47: ***SIMYB21*-Promoteraktivität im Blütenstadium 4**

Gezeigt ist die *GUS*-Färbung (7 h) von halbierten Knospen von drei unabhängigen Linien (T₁), die *GUS:GFP* unter der Kontrolle eines 1,5 kb *MYB21*-Promoters exprimieren.

Die gewebespezifische Aktivität des Promoters kann allerdings wie bereits erwähnt stark von regulatorischen Elementen innerhalb der Gensequenz abhängen, weshalb der klonierte, putative *MYB21*-Promoter für den Komplementationsversuch der *myb21-2* genutzt wurde. Die genomische Sequenz von *MYB21* wies ein gekürztes, zweites Intron und einen C-terminalen *Flag*-Tag auf. Die Klonierungsvektoren enthielten jeweils eine zweite Expressionskassette für die Kanamycin- oder Hygromycin-Resistenz (Abb. 48 und 49). Erstere wurde für die stabile Transformation von Wildtyp- und letztere für die Transformation von heterozygoten *myb21-2*-Keimblättern (die bereits eine Kanamycin-Resistenz enthielten) genutzt. Die transgenen Wildtyp-Primärtransformanten wurden mit *myb21-2* gekreuzt und drei der daraus resultierenden F₂-Linien hinsichtlich *myb21-2* Genotyp und dem Vorhandensein des *MYB21*-Transgens genotypisiert. Das Transgen konnte mittels einer eingebrachten, stillen Mutation *upstream* der *myb21-2*-Mutation detektiert werden. In jeder der drei Linien wurden mehrere dem entsprechende Pflanzen detektiert, die jedoch ausschließlich den *myb21-2*-Phänotyp zeigten. Die Blüten öffneten

sich stark verzögert mit noch welligen Kronblättern und das Fruchtblatt vergrößerte sich bereits stark vor der Seneszenz der Antherenkronen (Abb. 48). Alle gebildeten Früchte waren samenlos.

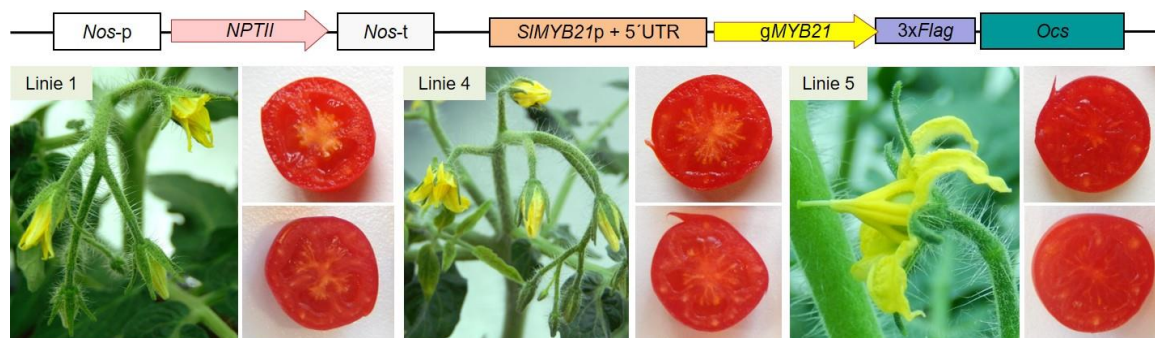


Abb. 48: Defekte in der Blütenöffnung und samenlose Früchte in der F₂ von transgenen *myb21-2*-Linien

Gezeigt sind sich öffnende und offene Blüten sowie samenlose Früchten der F₂ von drei unabhängigen, *myb21-1* homozygoten Linien aus der Kreuzung von *MYB21*pro::g*MYB21*:Flag im Wildtyp-Hintergrund (Konstrukt oben abgebildet) mit *myb21-2*.

Die Transformation von heterozygoten *myb21-2*-Keimblättern brachte vier transgene Primärtransformanten hervor. Drei von ihnen wurden in der T₁-Generation wie zuvor beschrieben auf den *myb21-2*-Genotyp und das Vorhandensein des *MYB21*-Transgens geprüft. In zwei Linien konnten ein bzw. zwei „Zielindividuen“ identifiziert werden, die ebenfalls den *myb21-2*-Phänotyp aufwiesen und samenlose Früchte bildeten (Abb. 49). Somit blieb die Komplementation der *myb21-2* erfolglos.

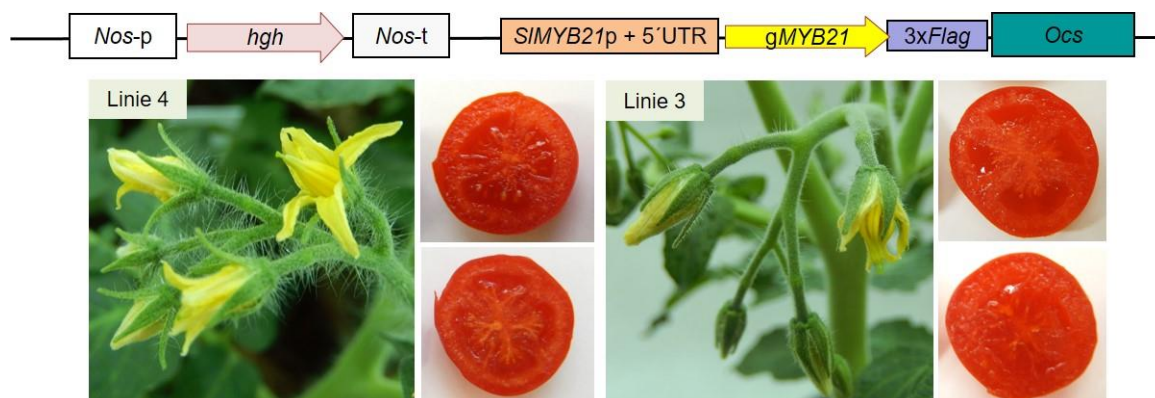


Abb. 49: Defekte in der Blütenöffnung und samenlose Früchte in transgenen *myb21-2*-Linien

Gezeigt sind sich öffnende Blüten sowie samenlose Früchte von zwei Linien der T₁ mit *MYB21*pro::g*MYB21*:Flag (Konstrukt oberhalb abgebildet) im *myb21-2*-Hintergrund.

Die Analyse der Expression des endogenen und transgenen *MYB21* in den beiden zuletzt genannten Linien zeigte eine deutlich geringe Expression von endogenem *MYB21* im *myb21-2*-Hintergrund als im Wildtyp und keine Expression des Transgens

(Abb. 50). Dies lässt sich möglicherweise auf das verkürzte zweite Intron oder eine unvollständige Promotersequenz zurückführen. Da auch die Überexpression von *MYB21* erfolglos war, kann eine post-transkriptionelle Kontrolle ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Die Komplementation der *myb21-2*-Mutante ist daher zunächst nicht möglich, da keine Expression des Komplementationskonstruktes nachweisbar war.

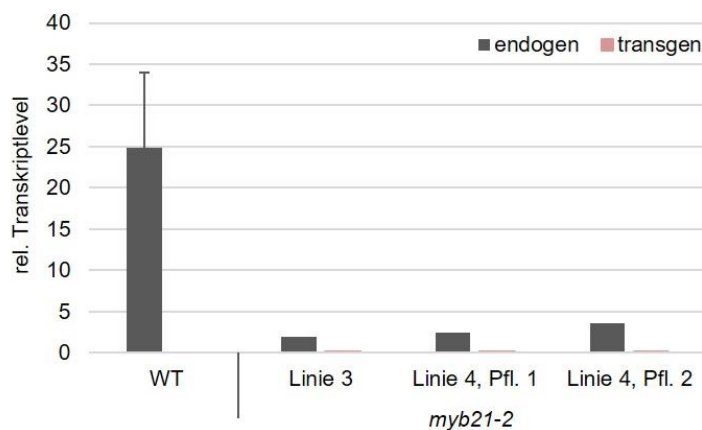


Abb. 50: **Expression von endogenem (rückwärts-Primer in der 3'-UTR) und transgen eingebrachtem *MYB21* (rückwärts-Primer im *Flag*-Tag) in transgenen *myb21-2*-Linien**

Die relative Transkriptmenge *bezogen auf TIP41* wurde in Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 der einen Pflanze der Linie 3 und den zwei Pflanzen der Linie 4 mit *MYB21pro::gMYB21:Flag* (Trafo mit Hygromycin-Resistenz) im *myb21-2* Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp ($n = 3$, \pm Standardfehler) bestimmt.

2.2.4.6 Differenzielle Genexpression im Fruchtblatt des Blütenstadiums 3

Von vorrangigem Interesse für diese Arbeit war, welche Gene von MYB21 reguliert werden und damit für die Ausbildung des Phänotyps in den *myb21*-Mutanten verantwortlich waren. Um die Regulation der Genexpression sowohl durch MYB21 als auch JA unabhängig voneinander betrachten zu können, wurden Transkriptprofile durch eine Illumina-Sequenzierung von Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 von Wildtyp, *jai1-1*- und *myb21-2*-Pflanzen erstellt (GATC Biotech AG). Dabei zeigten sich 1710 Gene (709 hoch und 1001 herunter) in *jai1-1* und nur 806 Gene (381 hoch und 425 herunter) in *myb21-2* im Vergleich zum Wildtyp differentiell reguliert (Abb. 51; Anhang Tab. 10, CD). Gegensätzlich signifikant fehlreguliert in *jai1-1* und *myb21-2* waren 27 Gene. Gene, die in beiden Mutanten in gleicher Weise dereguliert waren, stellen putative Zielgene der JA-abhängigen MYB21-Aktivität dar und waren damit von vorrangigem Interesse für die vorliegende Arbeit.

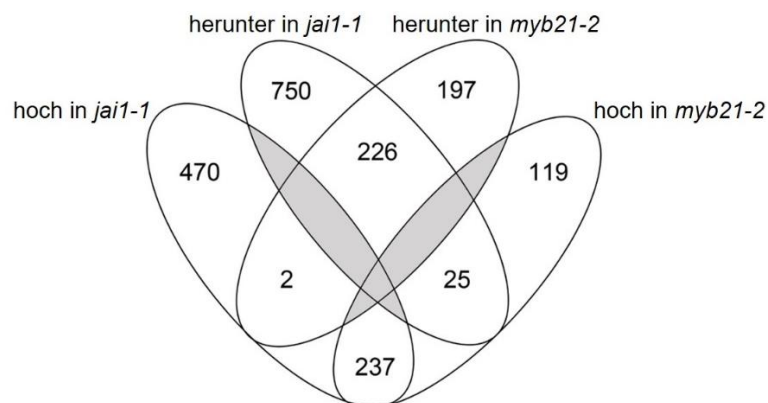


Abb. 51: **Venn-Diagramm mit der Anzahl der signifikant differentiell regulierten Gene in Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 von *jai1-1* und *myb21-2* im Vergleich zum Wildtyp**
Die Kriterien für die Auswahl der Gene waren ein $|LFC|$ (\log_2 fold change) > 1 und FDR (*false discovery rate*) $\leq 0,05$ ($n = 3$). Die Abbildung ist aus Schubert et al. (2019) entnommen.

2.2.4.6.1 Herunterregulierte Gene

In beiden Mutanten waren 237 Gene signifikant niedriger exprimiert als im Wildtyp (Abb. 51; Anhang Tab. 10, CD). Unter den TF-kodierenden Genen fanden sich *MYB21* selbst sowie weitere MYB-TFs, wie *MYB24*, der in *A. thaliana* redundante Funktionen zu *MYB21* in der Staubblattentwicklung aufweist (Mandaokar et al., 2009). Ein weiterer deregulierter MYB-Faktor war *FSM1*, der in Tomate spezifisch während der frühen Fruchtentwicklung exprimiert ist und Zellexpansionen negativ beeinflusst (Barg et al., 2005; Machemer et al., 2011). In der Gruppe von den in *jai1-1* und *myb21-2* signifikant niedriger exprimierten bHLH-TFs kodierenden Genen war ein Vertreter (*Solyc03g113560*), dessen Homolog *AtBIGPETALp* in *A. thaliana* die Größe der Kronblättern negativ beeinflusst (Varaud et al., 2011). Diese Daten geben Hinweise

darauf, dass MYB21 in die Regulierung der Determination der Zellgrößen im Fruchtblatt der noch geschlossenen Knospe (Stadium 3) involviert ist. Diese Hypothese wird durch zwei weitere in beiden Mutanten herunterregulierten Gene, die für Cellulose-Synthasen kodieren, verstärkt. Cellulose-Synthasen sind im Allgemeinen an der Erhaltung der Zellform beteiligt.

Die Fehlregulierung von JA und MYB21 könnte des Weiteren einen Einfluss auf die Auxin-Homöostase haben. So waren UDP-Glukosyltransferasen kodierende Gene, die als Auxin-modifizierende Enzyme annotiert wurden, ein Auxin-Efflux-Transporter (*PIN-formed*, PIN) sowie zwei GH3.8 IAA-Amido-Synthetasen (*Solyc02g064830* und *Solyc07g063850*), die in die Inaktivierung von Auxin involviert sind, in beiden Mutanten signifikant niedriger exprimiert als im Wildtyp.

Der Großteil der genannten Gene wurde mittels qPCR validiert (Abb. 52; Anhang Tab. 1). Dabei zeigten die wenigen Gene, die in der qPCR-Analyse keine signifikant geringeren Transkriptlevel in den Mutanten aufwiesen, dennoch die Tendenz in diese Richtung.

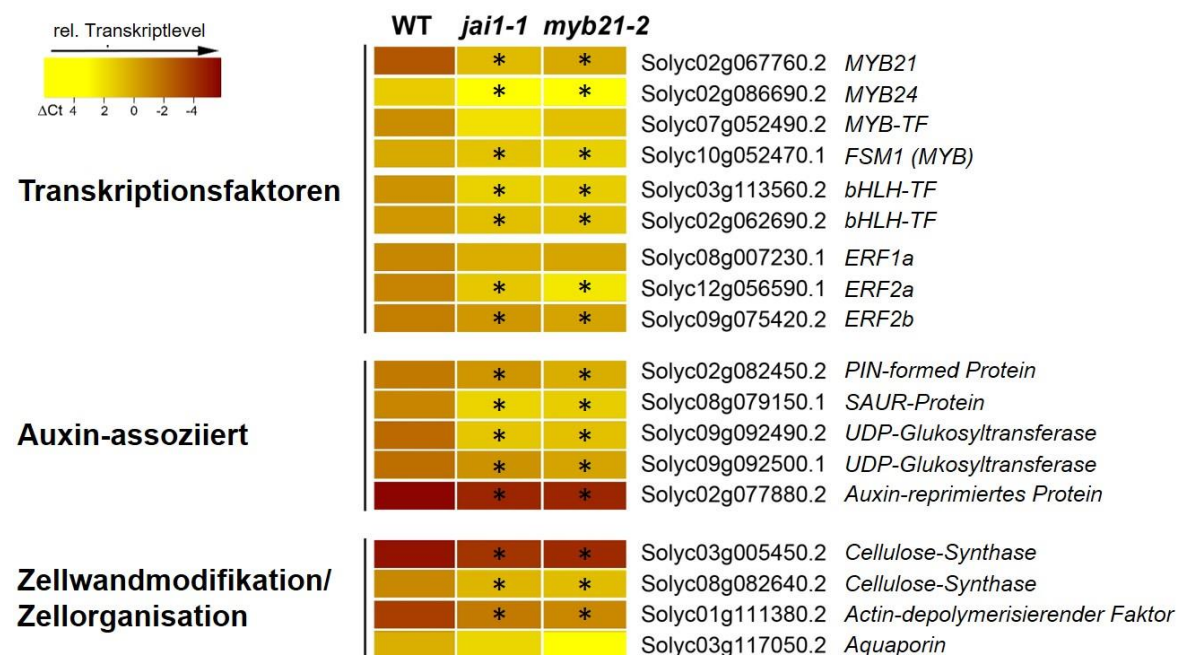


Abb. 52: Validierung der RNASeq-Daten für eine Auswahl an herunterregulierten Genen

Für die qPCR wurden unabhängige Fruchtblatt-Proben des Blütenstadiums 3 des Wildtyps, *jai1-1* und *myb21-2* verwendet. Der Farbkodex entspricht den ΔC_t -Werten, wobei gelb einen hohen Wert und damit eine niedrige relative Expression und dunkelrot einen niedrigen ΔC_t -Wert und damit eine hohe relative Genexpression darstellt. Der Signifikanztest erfolgte mit den Werten der relativen Transkriptlevel mittels 1-faktorieller ANOVA mit anschließendem TUKEY-Test mit $p \leq 0,05$; wobei * einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp zeigt ($n = 3$).

Für eine kleinere Auswahl an Genen wurde die relative Transkriptmenge im Fruchtblatt des Wildtyps über den Verlauf der Blütenentwicklung von Stadium 1 bis 6 mittels qPCR

ermittelt. Dies sollte einen Vergleich mit der Expressionskinetik von *MYB21* und damit Schlüsse über mögliche Interaktionspartner erlauben. Das Transkriptlevel von *MYB21* nahm ab Blütenstadium 1 bis zu einem Maximum im Stadium 4 zu und fiel in der geöffneten Blüte auf das Level des Stadiums 3 (Abb. 53). Interessanterweise wiesen einige Gene, wie *MYB24*, der *BIGPETALp* homologe bHLH-TF, eine Cellulose-Synthase (*Solyc08g082640*) sowie ein Aquaporin (*Solyc03g117050*) eine ähnliche Kinetik auf, wobei ein deutlicher Transkriptanstieg allerdings erst ab Stadium 3 zu beobachten war. *MYB24* und das *Aquaporin* erreichten ihr Transkriptmaximum um ein Stadium versetzt im Blütenstadium 5. Die zweite untersuchte Cellulose-Synthase erreichte ihre höchsten Transkriptmengen bereits ab Stadium 2 bis einschließlich 4, die danach auf ein zum Stadium 1 vergleichbares Level sanken. Einen komplett anderen Expressionsverlauf zeigte nur *FSM1*, dessen Transkriptmenge in den frühen Blütenstadien gleichbleibend war und nur im Verlauf der Blütenöffnung stark anstieg (Abb. 53).

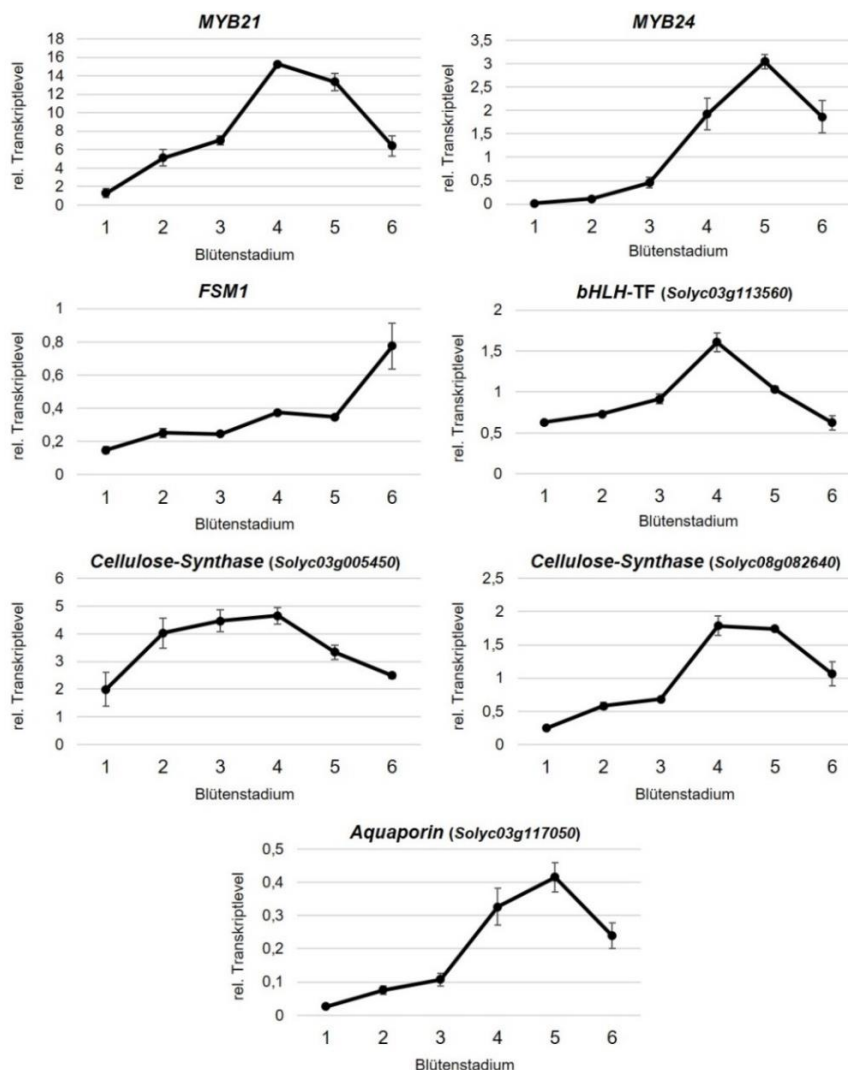


Abb. 53: **Wildtyp-Expression von in *jai1-1* und *myb21-2* herunterregulierter Gene**
 Das relative Transkriptlevel bezogen auf *TIP41* wurde in den Fruchtblättern des Wildtyps der Blütenstadien 1 bis 6 bestimmt (n = 3, ± Standardfehler).

2.2.4.6.2 Hochregulierte Gene

Aufgrund einer möglichen Funktion von MYB21 in der Hemmung bestimmter Entwicklungsprozesse waren die 226 in *jai1-1* und *myb21-2* signifikant hochregulierten Gene ebenso von Interesse (Abb. 51; Anhang Tab. 10, CD). Hierbei fanden sich Gene für zwei Pektinesterasen (*Solyc03g083770* und *Solyc11g019910*) und eine Pektinacetylerase (*Solyc08g014380*), deren Funktion im Allgemeinen in der Pektinspaltung und damit der Zellseparation liegt. Zusätzlich fielen einige für TFs kodierende Gene auf, deren Funktion in der Frucht- oder Embryonalentwicklung in Tomate bekannt ist. Dazu gehörten *MYB12*, ein Zinkfinger-Homeodomäne 1-Protein (*Solyc04g014260*) sowie ein ERF (*Solyc07g018290*) kodierendes Gen. Im Hinblick auf Phytohormone waren u.a. Cytokinin-assoziierte Gene in beiden Mutanten hochreguliert, wie die für eine Cytokinin-Oxidase/ -Dehydrogenase1 sowie für zwei Histidin-Kinasen (*Solyc02g083670* und *Solyc02g083680*) kodierenden Gene.

Mittels Gen-Ontologie (GO)-Analysen wurden in ihrer Expression auffallende Gengruppen ermittelt (Dr. Benedikt Athmer) und mittels der Software Cytoscape visualisiert (Anhang Abb. 2, CD). Dabei zeigten sich u.a. die Gengruppen für den „Auxin-aktivierten Signalweg“ sowie für den „Gibberellinsäure-vermittelten Signalweg“ (Abb. 54 und 56).

In der Gengruppe des „Auxin-aktivierten Signalweges“ befanden sich zahlreiche ARFs, wobei insbesondere *ARF9A*, *ARF4* und *ARF1* bereits für sich genommen in *jai1-1* und *myb21-2* im Vergleich zum Wildtyp signifikant höher exprimiert waren (Abb. 54; Anhang Tab. 10, CD). Auch Gene, die für PINs und Aux/IAA-Proteine kodieren, zeigten erhöhte Expressionen in beiden Mutanten (Abb. 54; Anhang Tab. 10, CD). Die Expressionsunterschiede von beispielsweise *AUX/IAA14* ließen sich allerdings nicht mittels unabhängigen Proben durch qPCR validieren (Abb. 57). Dies könnte in der starken Abhängigkeit der Auxin-Signalwirkung von der Tageszeit und der hohen Fluktuation der Aux/IAA-Proteine begründet liegen.

Die verschiedenen ARFs regulieren sehr wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen innerhalb der Blütenentwicklung. So sanken beispielsweise die Transkriptlevel von *ARF9A* und *ARF4* im Wildtyp in den frühen Blütenstadien stetig, stiegen im Fall von *ARF9A* zum Zeitpunkt der Bestäubung jedoch wieder, während die Transkriptmengen von *ARF4* niedrig blieben (Abb. 55). In *jai1-1* und *myb21-2* wurde die Expression von *ARF9A* bereits in der geschlossenen Knospe induziert und die von *ARF4* nicht wie im Wildtyp herunterreguliert. Zusammengefasst deuten die Daten auf eine Fehlregulierung der Auxin-Signalwirkung in Fruchtknoten von *jai1-1* und *myb21-2* hin.

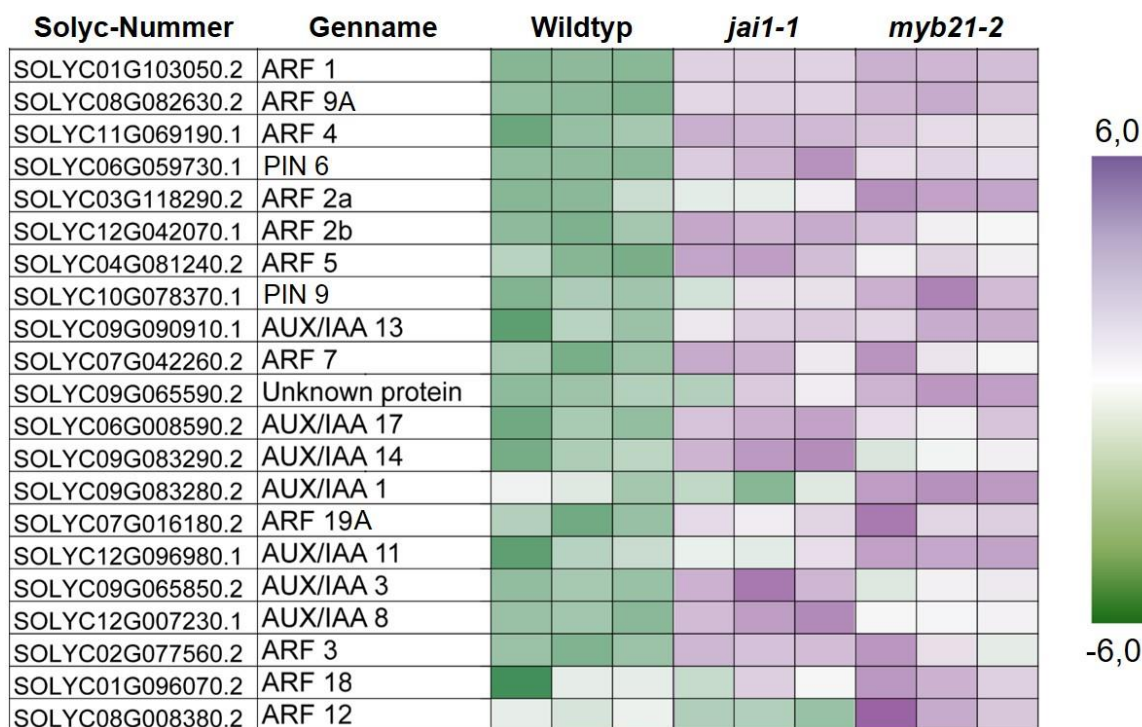


Abb. 54: **Heatmap** für die nach GO-Analyse differentiell regulierte Gengruppe „Auxin-aktivierter Signalweg“

Die Darstellung wurde mit der Cytoscape-Software erstellt. Grundlage war die zeilenskalierte Darstellung des „Knotens“ für den „Auxin-aktivierten Signalweg“ der *Enrichment Map* aus den logarithmierten Expressionswerten (FPKM+1) mit $q = 0,15$ der Fruchtblattproben des Wildtyps, *jai1-1* und *myb21-2*. Dabei verdeutlicht intensives lila hohe und dunkelgrün niedrige Expressionswerte. Die Abbildung ist aus Schubert et al. (2019) entnommen.

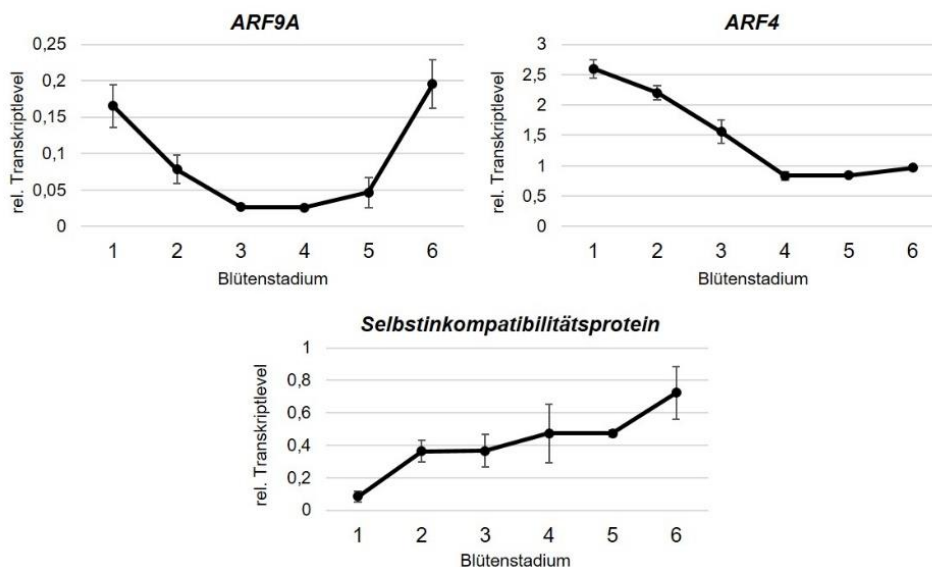


Abb. 55: **Expression von ARF9A und ARF4 im Wildtyp**

Das relative Transkriptlevel bezogen auf *TIP41* wurde in den Fruchtblättern des Wildtyps der Blütenstadien 1 bis 6 bestimmt ($n = 3$, \pm Standardfehler).

Gene in der überrepräsentierten Gruppe des „Gibberellinsäure-vermittelten Signalweges“ standen hauptsächlich im Zusammenhang mit deren Biosynthese, wie die CPS und die in Abbildung 56 gezeigten *GA 20-Oxidase-3* und *-1* sowie die *GA 3-β-Hydroxylase*.

Solyc-Nummer	Genname	Wildtyp	<i>jai1-1</i>	<i>myb21-2</i>
SOLYC11G072310.1	Gibberellin 20-oxidase-3	grün	lila	lila
SOLYC03G006880.2	Gibberellin 20-oxidase-1	grün	lila	lila
SOLYC06G066820.2	Gibberellin 3-beta-hydroxylase	grün	lila	lila

Abb. 56: Heatmap für die nach GO-Analyse differentiell regulierte Gengruppe „Gibberellinsäure-vermittelter Signalweg“

Die Darstellung wurde mit der Cytoscape-Software erstellt. Grundlage war die zeilenskalierte Darstellung des „Knotens“ für den „Gibberellinsäure-vermittelten Signalweg“ der *Enrichment Map* aus den logarithmierten Expressionswerten (FPKM+1) mit $q = 0,15$ der Fruchtblattproben des Wildtyps, *jai1-1* und *myb21-2*. Dabei verdeutlicht intensives lila hohe und dunkelgrün niedrige Expressionswerte (siehe Legende Abb. 54). Die Abbildung ist aus Schubert et al. (2019) entnommen.

Die qPCR-Validierung einiger der genannten sowie Zellwand- und Befruchtungs-assoziierten Gene war vor allem aufgrund einer oft sehr geringen Expression im Wildtyp und damit einhergehenden großen Standardfehlern nicht immer signifikant (Abb. 57; Anhang Tab. 2). Die Tendenz einer höheren Expression in *jai1-1* und *myb21-2* ließ sich jedoch fast immer erkennen.

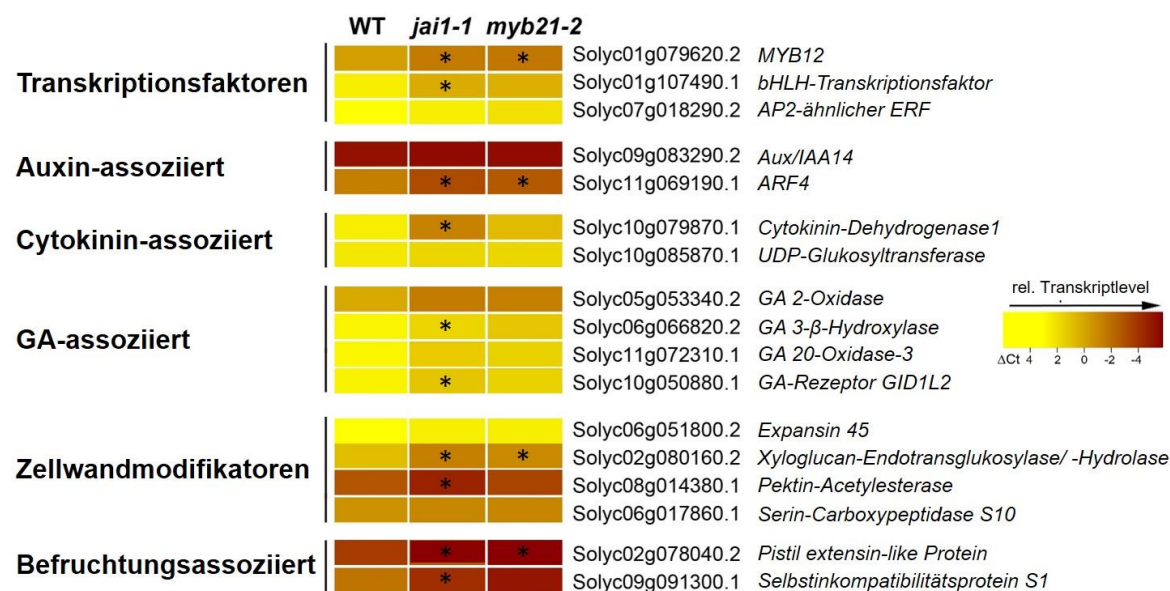


Abb. 57: Validierung der RNASeq-Daten für eine Auswahl an hochregulierten Genen

Für die qPCR wurden unabhängige Fruchtblatt-Proben des Blütenstadiums 3 des Wildtyps, *jai1-1* und *myb21-2* verwendet. Der Farbkodex entspricht den ΔC_t -Werten, wobei gelb einen hohen Wert und damit eine niedrige relative Expression und dunkelrot einen niedrigen ΔC_t -Wert und damit eine hohe relative Genexpression darstellt. Der Signifikanztest erfolgte mit den Werten der relativen Transkriptlevel mittels 1-faktorieller ANOVA mit anschließendem TUKEY-Test mit $p \leq 0,05$; wobei * einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp zeigt ($n = 3$).

2.2.4.7 Gehalte an GAs im Fruchtblatt des Blütenstadiums 3

Aufgrund der erhöhten Transkriptlevel von GA-Biosynthese-assoziierten Genen in *jai1-1*- und *myb21-2*-Fruchtblättern wurden die Gehalte von diversen Vorläufer-, biologisch aktiven und inaktiven Formen bestimmt (Abb. 58; Anhang Tab. 3). Der vorherrschende Biosyntheseweg in Tomate beinhaltet die C13-Hydroxylierung des Vorläufers GA₁₂. Daher war es nicht überraschend, dass GA₁₅ nicht detektiert werden konnte. Zwei Vorläufer-Formen des C13-Hydroxylierungsweges (GA₅₃ und GA₁₉) waren in *jai1-1* und *myb21-2* signifikant erhöht zum Wildtyp. Die biologisch aktive Form GA₁ zeigte allerdings keine veränderten Gehalte. Nur für GA₄, welches das aktive GA aus dem Biosyntheseweg ohne C13-Hydroxylierung darstellt, ließ sich im Fruchtblatt von *jai1-1*-Pflanzen ein erhöhter Gehalt feststellen. Die biologisch inaktiven Formen GA₈ und GA₂₉ sowie GA₃₄ zeigten ebenso nur in *jai1-1* erhöhte Level. Im Großen und Ganzen unterschieden sich die Gehalte an GAs in den beiden Mutanten nicht stark von jenen des Wildtyps. Damit ließ sich die Parthenokarpie der Mutanten nicht hinreichend auf zum Wildtyp veränderte GA-Gehalte im Fruchtblatt zurückführen.

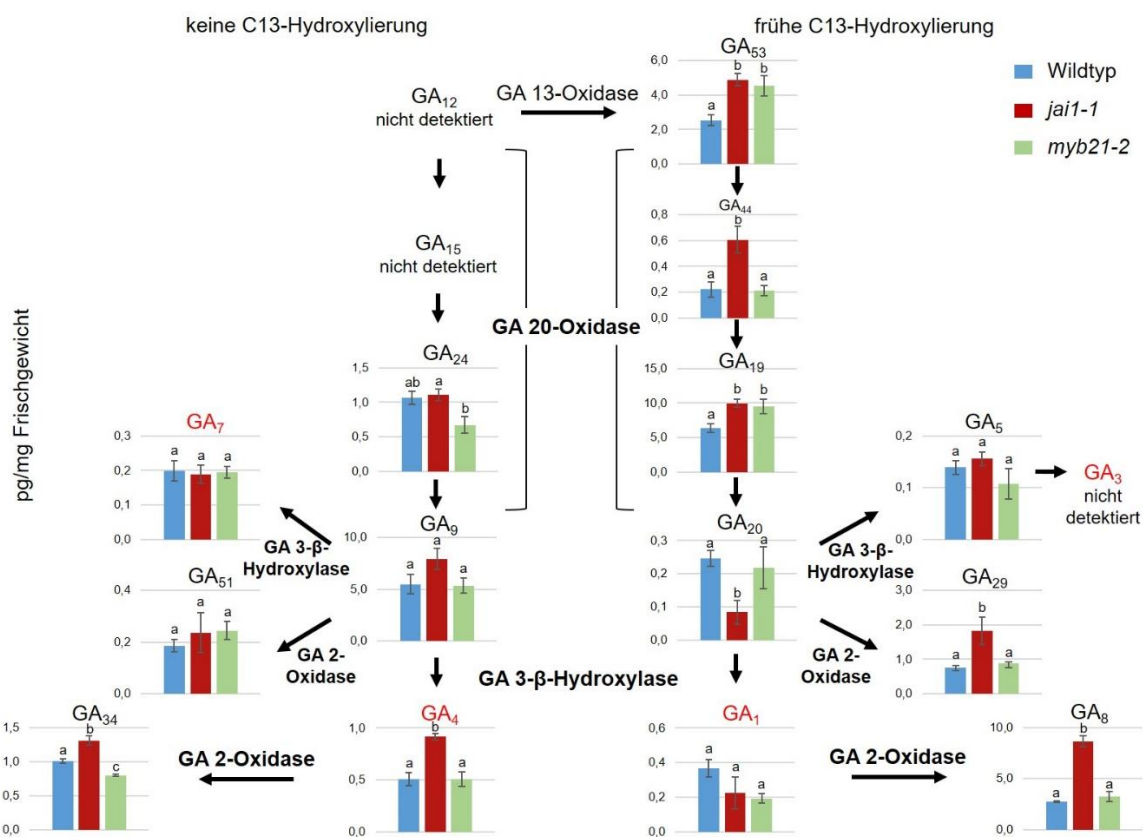


Abb. 58: Gehalte an GA in Fruchtblättern des Blütenstadiums 3

Gezeigt sind die GA-Gehalte (pg/mg Frischgewicht) in Wildtyp (blau), *jai1-1* (rot) und *myb21-2* (hellgrün) mit Nennung aller katalysierenden Enzyme, unterteilt in den Biosyntheseweg ohne (links) und mit C13-Hydroxylierung von GA₁₂ (rechts). In rot sind die biologisch aktiven Formen hervorgehoben. Der Signifikanztest erfolgte mittels 1-faktorieller ANOVA mit anschließendem TUKEY-Test mit $p \leq 0,05$; wobei verschiedene Buchstaben signifikante Unterschiede darstellen ($n = 5$, \pm Standardfehler). Die Abbildung ist aus Schubert et al. (2019) entnommen.

Die Daten deuten darauf hin, dass MYB21 im Tomatengynoeceum die Expression von Genen, die an der Determinierung der Zellgröße sowie der Auxin- und GA-Signalwirkung beteiligt sind, reguliert. Es lässt sich vermuten, dass MYB21 eine zentrale Rolle in der zeitlichen Abstimmung von Entwicklungsprozessen kurz vor der Befruchtung und bei der Fruchttinitierung spielt. In den *myb21*-Mutanten beginnen die Fruchtbildungsprozesse im Fruchtblatt wahrscheinlich bereits vor der Blütenöffnung und damit auch vor der Befruchtung.

3 Diskussion

Vor allem für Selbstbestäuber wie *S. lycopersicum* ist die zeitlich koordinierte Entwicklung der männlichen und weiblichen Gameten als auch der gesamten Blüte von großer Bedeutung. Diese Regulierung wird zum Teil durch Phytohormone gesteuert. Dabei spielen JAs in der Ausbildung der Fertilität eine wichtige Rolle, wobei sich ihre konkreten Wirkungsorte und –mechanismen innerhalb der Blüte artspezifisch unterscheiden können. Die Vermittlung der JA-Funktion durch MYB-TFs in der Entwicklung des Tomatengynoeciums wurde näher untersucht. Die Auswahl von MYB14 und MYB21 erfolgte dabei auf Basis der fehlenden Expression der kodierenden Gene in *jai1-1* (Schubert et al., 2019).

3.1 MYB14 – Frage nach einer Funktion in der Fruchtblattentwicklung bleibt offen

Der *MYB14*-Orthologe in *A. thaliana*, *AtMYB13*, wird fast ubiquitär in der Pflanze exprimiert (Klepikova et al., 2016) und ist in diverse biologische Prozesse involviert. So wird er u.a. GA-abhängig durch DELLA-Proteine in geschlossenen Knospen induziert und könnte damit in die Blütenentwicklung involviert sein (Cao et al., 2006). Um zu testen, ob MYB14 in Tomate eine Rolle in der JA-Funktion im Fruchtblatt spielt, sollte dieser TF im *jai1-1*-Hintergrund überexprimiert werden. Unter Verwendung des 35S-Promoters konnten zum Teil stark erhöhte Transkriptlevel im Blatt nachgewiesen werden (Abb. 20 und 23). Somit war das Überexpressionskonstrukt funktional. Dabei hatte die ektopische Expression des laut eFP Browser Datenbank blütenspezifischen TFs (Winter et al., 2007; Tomato Genome Consortium, 2012) offenbar keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Pflanze, was die Entwicklung zahlreicher, transgener Linien zeigte. Es ließen sich jedoch in keiner Linie erhöhte *MYB14*-Transkriptlevel im Fruchtblatt detektieren (Abb. 20 und 23) und keine der transgenen Pflanzen bildete Samen. Der 35S-Promoter ist ein starker konstitutiver Promoter, der in den meisten pflanzlichen Geweben aktiv ist. Sein Aktivitätsmuster in spezifischen Geweben, insbesondere in den Gameten, unterscheidet sich allerdings zwischen den einzelnen Arten und eine Aktivität in den reproduktiven Teilen der Tomatenblüte kann nicht vorausgesetzt werden (Hraska et al., 2007; de Mesa et al., 2004; van der Leede-Plegt et al., 1992; Dutt et al., 2014). Damit kann die fehlende *MYB14*-Überexpression darin begründet liegen, dass sich der 35S-Promoter nicht zur Überexpression im Fruchtblatt von Tomate eignet.

Alternative Ansätze waren daher die Verwendung des blütenspezifischen *LepC3* (Sorkina et al., 2011) sowie des *Cel1*-Promoters. *Cel1*-mRNA wurde bisher in

Abszissionszonen, Antheren, Blättern sowie Samenanlagen von Tomate nachgewiesen (Lashbrook et al., 1994; Flors et al., 2007; Schubert et al., 2019). Es konnte jedoch in keinem Versuch eine Überexpression im Fruchtblatt der transgenen Linien, weder in der offenen Blüte noch im Stadium 3, detektiert werden (Abb. 20, 26 und 28). Demnach waren alle generierten Linien im *jai1-1*-Hintergrund (Abb. 28) samenlos.

Somit waren alle *MYB14*-Überexpressionsversuche erfolglos. Dies deutet evtl. auf eine post-transkriptionelle Regulation im Fruchtblatt hin, wodurch es zur Stilllegung des Gens kommt. Oder aber alle drei verwendeten Promotersequenzen waren nicht lang genug um eine natürliche, vollständige Aktivität zu erreichen. Damit kann keine Aussage über eine JA-vermittelte Funktion von *MYB14* in der Entwicklung des Tomatengynoeceums mit den Samenanlagen getroffen werden.

Die beiden untersuchten TILLING-Linien eigneten sich ebenfalls nicht zur Untersuchung der Rolle von *MYB14*, da die Mutationen keine konservierten Aminosäuren betrafen und der Austausch einer einzelnen, „zufälligen“ Aminosäure wahrscheinlich nicht zum Funktionsverlust führte (Abb. 32). Ebenso waren die CRISPR/Cas9-generierten, transgenen *MYB14*-Linien nicht aussagekräftig. Es konnten zwar Mutationen im ersten Exon nachgewiesen werden (Abb. 39). Die zum Teil auftretende Sterilität konnte allerdings nicht eindeutig auf die *MYB14*-Mutationen zurückgeführt werden. Der Transformationsansatz müsste wiederholt werden und eine größere Anzahl von *loss-of-function*-Linien generiert werden. Falls homozygote, transgene Linien einen zum Wildtyp veränderten Blütenphänotyp aufweisen würden, könnten Transkriptomanalysen putative Zielgene identifizieren. Dabei ist es möglich, dass *MYB14* aufgrund eines konservierten EAR-Motives als Repressor fungiert (Li et al., 2016).

3.2 Charakterisierung von *MYB21*

Aufgrund der bereits bekannten Funktionen von *AtMYB21* in der Staubblattentwicklung von *A. thaliana* (Mandaokar et al., 2006; Song et al., 2011; Reeves et al., 2012) sowie der überaus hohen Expression in Wildtyp- im Vergleich zu sehr niedrigen Transkriptmengen in *jai1-1*-Samenanlagen war der TF ein vielversprechender Kandidat für die Vermittlung von JA-Funktionen in Tomatenfruchtblättern (Schubert et al., 2019).

3.2.1 Analogien zwischen *MYB21* aus *A. thaliana* und *S. lycopersicum*

Zur Untersuchung der funktionellen Äquivalenz zu *AtMYB21* wurde *MYB21* aus Tomate unter Kontrolle des endogenen *A. thaliana*-Promoters im *Atmyb21-5*-Hintergrund (Reeves et al., 2012) exprimiert. Dabei konnte eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps hinsichtlich der Blütenöffnung beobachtet werden sowie eine teilweise Wiederherstellung der Filamentlänge mit in der Regel leicht längeren Filamenten als

myb21-5. Nur in einzelnen Pflanzen von zwei Linien erreichten die Filamente Wildtyplänge und es kam zur Bildung von Schoten mit Samen. Interessanterweise wird diese nur unvollständige Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps auch bei der Expression von *AtMYB21* selbst erreicht (Abb. 30; Dr. Ivan Acosta, pers. Mitteilung). Dies lässt auf eine komplexe Regulierung der *AtMYB21*-Expression in *A. thaliana* schließen. Möglicherweise sind *downstream*-Elemente zur Erlangung der natürlichen Transkriptlevel nötig. Auf Besonderheiten in der Regulierung weisen auch zwei lange nicht-kodierende RNAs hin, die *upstream* (in der klonierten Promotersequenz enthalten) und *antisense* in der 5'-UTR von *AtMYB21* kodiert sind (The Arabidopsis Information Resource (TAIR), www.seqviewer.arabidopsis.org/servlets/sv?action=sequence&chr=3&start=10305849&type=gene auf www.arabidopsis.org). Des Weiteren existiert ein *antisense*-Transkript über die ersten beiden Exons (TAIR, www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=38209&type=locus) und *GUS*-Linien unter der Kontrolle der *antisense*-Sequenz des zweiten Introns zeigten eine starke *GUS*-Färbung in noch nicht gestreckten Filamenten (Dr. Ivan Acosta, pers. Mitteilung). *AtMYB21*-Promoter-*GUS*-Linien führen nur zur *GUS*-Aktivität in den Kelch- und Kronblättern, den Nektarien sowie dem apikalen Teil der Filamente in bereits geöffneten Blüten (Reeves et al., 2012; Dr. Ivan Acosta, pers. Mitteilung). Die forcierte Expression von *SIMYB21* in den besagten Geweben aufgrund der Regulierung durch die *AtMYB21*-Promotersequenz führte zu einer mit *AtMYB21* vergleichbaren Funktionsausübung. Diese funktionelle Äquivalenz der beiden TFs weist auf eine Konservierung von MYB21-Proteinen und deren Interaktionspartnern bzw. Zielgenen hin. Die artspezifische Wirkungsweise wird eventuell hauptsächlich durch unterschiedliche Expressionsmuster erreicht.

In *A. thaliana* wurde eine JA-vermittelte *downstream*-Regulierung von *AtMYB21* durch die Bindung von JAZ-Proteinen gezeigt. Konkret wurde eine Interaktion mit *A. thaliana* JAZ1, -8, -10, -11 und in einer weiteren Studie sogar zusätzlich JAZ2, -3, -4, -5, -6 und -12 nachgewiesen (Song et al., 2011; Huang et al., 2017). Aufgrund der Ergebnisse der Komplementationsstudien in *A. thaliana* wurden MYB21-JAZ-Interaktionen auch in Tomate für möglich gehalten. In Tomate wurden zwölf JAZ-Proteine (JAZ1 - 11, JAZ13) identifiziert (Chini et al., 2017). JAZ12 besitzt keine Jas-Domäne und wurde daher in der vorliegenden Arbeit nicht als kanonisches JAZ-Protein in Betracht gezogen. Von den zwölf JAZ-Proteinen ließ sich nur mit JAZ9 (und JAZ8, welches nur in Wurzeln exprimiert ist) eine Interaktion mittels drei unterschiedlicher Methoden nachweisen (Abb. 16 - 18). Für die BiFC-Studien wurden in Vorversuchen mit MYB21 und JAZ1 sowie JAZ9 alle möglichen Kombinationen mit der N- oder C-terminalen Fusion sowie der N- oder C-terminalen YFP-Hälfte getestet. Dabei stellt sich heraus, dass MYB21 am C- und das

JAZ-Protein am *N*-Terminus fusioniert sein sollte um eine putative Interaktion durch die Verbindung der beiden YFP-Hälften nachzuweisen. Dies geht einher mit der Tatsache, dass die *C*-terminale Jas-Domäne für die Interaktion mit dem TF verantwortlich ist und damit frei liegen sollte (Song et al., 2011). Für MYB21 war es vorteilhafter den *N*-Terminus frei zugänglich zu haben, was auf die Interaktion der *N*-terminalen MYB-Domänen mit dem JAZ-Protein hinweist und somit vergleichbar zu AtMYB21 wäre (Song et al., 2011). BiFC-Studien können zu einer Überinterpretation von schwachen Interaktionen führen, da die Bildung des YFP-Komplexes irreversibel ist und es zur zeitlichen Akkumulation des Signals kommen kann. Daher wurde eine zweite *in planta* Methode herangezogen, welche vergleichbar zum Hefe-Zwei-Hybrid-System den Nachweis der Expression von Reportergenen zur Detektion nutzt (Schreiber et al., 2019; *splitTALE*). Dabei führte allerdings die Kombination von MYB21 mit *C*-terminaler (*TALE*-Aktivierungsdomäne) und JAZ9 mit *N*-terminaler Fusion (*TALE*-Bindedomäne) zu keiner Interaktion, welche aus den vorher genannten Gründen sterisch von Vorteil sein sollte (Abb. 18). Möglicherweise ist das JAZ-Protein der determinierende Interaktionspartner und sollte nur einen kleinen Tag, wie die *TALE*-Aktivierungsdomäne mit einer Größe von ca. 6 kDa tragen. Die Bindedomäne ist mit ca. 90 kDa deutlich größer als JAZ9 selbst (13 kDa). Die Fusion mit einem derart großen Protein, egal an welcher Position, überdeckt möglicherweise JAZ9 komplett. Im Gegensatz dazu sind die YFP-Hälften im BiFC-Experiment mit 10 und 17,5 kDa verhältnismäßig klein. Nachweislich konnte die GUS-Aktivität demnach nur unter Verwendung der Fusionskombination *TALE*-Bindedomäne:MYB21 durch Zugabe von JAZ9:*TALE*-Aktivierungsdomäne signifikant gesteigert werden, was die Interaktion von MYB21 mit JAZ9 zeigte.

Die JA-vermittelte *downstream* Regulation von MYB21 durch JAZ-Proteine lässt den Schluss zu, dass die MYB21-Aktivität streng reguliert sein und somit bei einem Rückgang von JA-Ile sofort gehemmt werden muss. Allerdings interagiert MYB21 aus Tomate im Gegensatz zu AtMYB21, welcher mit zehn der 13 JAZ-Proteine interagiert, nur mit zwei JAZ-Proteinen. Zudem hat davon nur JAZ9 eine Bedeutung *in vivo*, welches im Vergleich zu den meisten anderen JAZ-Proteinen im Fruchtblatt des Wildtyps nur schwach exprimiert wird (Anhang Tab. 10).

Im Hinblick auf eine mögliche Rückkopplungswirkung von MYB21 auf die JA-Biosynthese deuten sich allerdings grundlegende Unterschiede zwischen *A. thaliana* und Tomate an. So sind in Knospen kurz vor der Blütenöffnung der *Atmyb21-5 myb24-5* die Transkriptgehalte von JA-Biosynthese-Enzymen kodierenden Genen wie *LOX2*, *LOX4*, *AOS* und *OPR3* sowie die JA-Gehalte stark erhöht. Reeves et al. (2012) postulieren daher eine negative Rückkopplungswirkung von AtMYB21 und AtMYB24 auf die JA-Biosynthese. In Tomatenfruchtblättern des Blütenstadiums 3 der *myb21-2* waren die

Transkriptmengen dieser Gengruppe nicht verändert und die JA-Gehalte sogar signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 37). Im Unterschied zu *A. thaliana* könnte dies in Tomate auf eine positive Rückkopplung von MYB21 auf die JA-Biosynthese hindeuten.

3.2.2 Komplexe Regulierung der Expression von MYB21

Um zu testen, ob die weibliche Sterilität der *jai1-1*-Mutante durch den Funktionsverlust von MYB21 verursacht wird, wurde *MYB21* im *jai1-1*-Hintergrund exprimiert. Hierbei wäre es möglich, dass es zur Wiederherstellung der Fertilität kommt, vergleichbar zur Expression von *35S::AtMYB21* in der *A. thaliana*-Mutante *coi1-1* (Song et al., 2011).

Ähnlich wie bei *MYB14* konnte unter Verwendung des *35S*-Promoters keine *MYB21*-Überexpression erreicht werden. Die *35S*-Promoter-*GUS*-Linie zeigte eine starke Aktivität in den Kelchblättern, der äußeren Zellschichten der Antheren und des Fruchtblattes in der geschlossenen Knospe, wobei die Samenanlagen allerdings eine weniger starke *GUS*-Färbung aufwiesen. Die Aktivität im Fruchtblatt nahm mit der Blütenöffnung stark ab (Abb. 24). Auch wenn im günstigsten Fall von einer Aktivität in den Samenanlagen ausgegangen wird, entspricht die Expressionskinetik nicht jener von *MYB21*. Dieser hat sein Expressionsmaximum im Blütenstadium 4 (Abb. 53), als der *35S*-Promoter bereits kaum noch Aktivität im Fruchtknoten aufwies. Im Stadium 1 hingegen ließ sich kaum *MYB21*-Transkript detektieren, die *GUS*-Färbung war jedoch am stärksten. Durch die Transformation mit der kodierenden Sequenz von *MYB21* wurde nur eine transgene Linie erhalten, die im Vergleich zu *jai1-1* eine geringe Erhöhung der Transkriptmenge im Fruchtblatt zeigte (Abb. 21). Aufgrund der erschwerten Identifizierung der hier definierten Blütenstadien in Primärtransformanten, wurde das Gynoeceum der geöffneten Blüte und nicht des Stadiums 3 oder 4 analysiert. Dennoch deutete auch das Ausbleiben der Samenbildung in dieser Linie entweder auf eine komplett fehlende Aktivität oder Aktivität zum falschen Zeitpunkt des *35S*-Promoters in den Samenanlagen hin. Hinzu kommt jedoch auch die Möglichkeit, dass *MYB21* wichtige regulatorische Elemente in den Introns besitzt, ohne die keine Expression stattfindet.

Unter Verwendung der genomischen Sequenz von *MYB21* konnten allerdings keine Transformanten generiert werden. Dies kann auf letale Effekte durch eine ektopische *MYB21*-Expression zurückzuführen sein. *MYB21* ist laut eFP-Browser Datenbank blütenspezifisch exprimiert (Winter et al., 2007; Tomato Genome Consortium, 2012). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten keine Transkripte im Blatt, weder im Grundzustand noch nach MeJA-Behandlung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine *MYB21*-Expression in der gesamten Pflanze führte bereits in *A. thaliana*

zur Ausbildung eines starken Zwergenwuchs, kleiner und schmaler Blätter sowie zur sowohl männlichen als auch weiblichen Sterilität (Shin et al., 2002). Die männliche Fertilität von *coi1* konnte jedoch durch die Expression von *AtMYB21* unter Kontrolle des 35S-Promoters zum Teil wiederhergestellt werden (Song et al., 2011). Dies war allerdings nur bei einer moderaten Überexpression möglich. In Linien mit einer über 20-fach höheren *AtMYB21*-Expression kam es zu Defekten in der Filamentelongation und Antherendehiszenz bis hin zur vollständigen Sterilität (Song et al., 2011). Die prinzipielle Möglichkeit der Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps unter Verwendung des 35S-Promoters in *A. thaliana* lässt sich durch folgende Erkenntnis erklären: Die Expression von *AtCOI1* unter der Kontrolle des in den Epidermiszellen aktiven *LIPID TRANSFER PROTEIN1*-Promoters in *coi1* führte zu signifikant längeren Filamenten im Vergleich zu nicht-transformierten *coi1*-Pflanzen sowie der Wiederherstellung der Pollenkeimung (Jewell und Browse et al., 2016). Somit ist in *A. thaliana* die JA-Perzeption in den Epidermiszellen der Antheren und Filamente ausreichend, um die JA-vermittelte Ausbildung der männlichen Fertilität sicherzustellen.

In Tomate ist es komplizierter, da die JA-vermittelten MYB21-Funktionen in den Samenanlagen erfolgen müssen und eine *MYB21*-Expression in der kompletten Pflanze wahrscheinlich letal ist. Hinzu kommen Hinweise, dass die *MYB21*-Expression einer bestimmten Kinetik folgen muss. So kommt es in der Auxin-hypersensitiven Mutante *entire*, die eine *loss-of-function* Mutation im Repressorprotein IAA9 trägt, im Vergleich zum Wildtyp zu einer signifikant erhöhten *MYB21*-Expression im Fruchtblatt der kleinen Knospe und unter bestimmten Umweltbedingungen ebenso zum Verlust der weiblichen Fertilität (Prof. Naomi Ori, unveröffentlicht). Somit ist eine zu starke, verfrühte oder komplett ausbleibende *MYB21*-Expression in Tomate mit vergleichbaren Defekten in der Blüten- und Samenentwicklung verbunden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei Promotoren *LepC3* und *Cel1*, die in den Samenanlagen sowohl des Wildtyps als auch der *jai1-1*-Mutante aktiv sein sollten, getestet. Für das *Cel1*-Gen wurde zumindest hinsichtlich des Anstiegs der Transkriptlevel von Blütenstadium 1 zu 3 ein vergleichbares Expressionsmuster zu *MYB21* detektiert (Doktorarbeit Susanne Dobritzsch). Es konnte jedoch in keinem Versuch eine überzeugende Überexpression im Fruchtblatt erreicht werden. Ähnlich den Experimenten mit *MYB14* könnte die Stilllegung des Gens als post-transkriptionelle Regulierung die Ursache sein. Hinzu kommt allerdings, dass die *MYB21*-Expression auch unter Kontrolle der endogenen Sequenz 1,5 kb *upstream* des *MYB21*-Translationsstartes in der *myb21-2-loss-of-function*-Mutante erfolglos blieb (Abb. 48 – 50). *MYB21* wurde immer mit einem verkürzten, zweiten Intron kloniert, weshalb die Probleme der fehlenden Expression auf regulatorische Elemente im zweiten Intron

zurückzuführen sein könnten. Zusätzlich ist es möglich, dass weitere *cis*-regulatorische Elemente in der 3'-UTR oder *upstream* der klonierten 1,5 kb -Sequenz liegen können. Diese Vermutungen werden aus den bereits genannten Beobachtungen in *A. thaliana* mit der nur teilweisen Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps von *Atmyb21-5* durch die Transformation mit *AtMYB21* unterstützt (Abb. 3; pers. Mitteilung Dr. Ivan Acosta,). Die Existenz eines *antisense*-Transkriptes oder langer, nicht kodierender *antisense* RNAs ist für MYB21 aus Tomate bisher nicht bekannt. Dies sollte in zukünftigen Experimenten durch die Expression von *MYB21 antisense*-Sequenzen überprüft werden. Die bisherigen Daten deuten bereits auf eine komplexe Regulierung der *MYB21*-Expression hin.

3.2.3 Funktionen von MYB21

3.2.3.1 Regulierung phänotypischer Blütenmerkmale durch MYB21

Zur Detektion der durch MYB21 vermittelten biologischen Prozesse innerhalb der Entwicklung des Fruchtblattes, wurden sowohl eine TILLING-Linie (*myb21-1*) als auch zwei CRISPR/Cas9-*loss-of-function*-Linien (*myb21-2* und *-3*) identifiziert bzw. hergestellt. Alle drei Linien wiesen eine gestörte, unvollständige Öffnung der Kronblätter sowie kaum Fruchtbildung im Falle von *myb21-1* oder eine ausbleibende Samenbildung in *myb21-2* und *myb21-3* auf (Abb. 34 und 43). Die Staubblätter ließen im Gegensatz zu *jai1-1* keinen offensichtlich veränderten Phänotyp erkennen und bildeten überwiegend vitale Pollen (Abb. 44). Dies verdeutlichte bereits die deutlich wichtigere Funktion von MYB21 in den Kron- und Fruchtblättern in Tomate. Die offensichtliche Fehlentwicklung der Blüte setzte mit dem Stadium 3 ein, dem Moment der höchsten JA- und *MYB21*-Transkriptakkumulation (Schubert et al., 2019). Bei genauerer Analyse der Fruchtblätter zeigten sich bereits im Blütenstadium 3 signifikant größere Organe sowie Unterschiede in der Morphologie der Samenanlagen (Anhang Abb. 1). Die innerste Schicht des Nucellus´ zeigte bereits in diesem Stadium vakuolisierte, unförmige Zellen (Abb. 35 und 45) als ein Zeichen für programmierten Zelltod (Rogers, 2005). Im Wildtyp wird die Degenerierung des Nucellus´ erst durch die Befruchtung der Zentralzelle ausgelöst (Lu und Magnani, 2018). So besteht in *A. thaliana* der Nucellus in unbefruchteten Samenanlagen selbst sechs Tage nach Befruchtung unverändert (Xu et al., 2016). Der in den *myb21*-Tomatenmutanten beobachtete beginnende Abbau bereits vor Blütenöffnung lässt vermuten, dass JA vermittelt durch MYB21 die verfrühte Nucellus-Seneszenz verhindert und damit die Befruchtung und Initiierung der Fruchtbildung zeitlich aufeinander abstimmt. Das Wachstum des Gynoeceums setzte in *myb21-2* somit unabhängig von der Befruchtung bereits vor Blütenöffnung ein. Dies erklärt auch die zum

Teil aufgetretene Fruchtbildung in emaskulierten Blüten, was im Wildtyp nicht zu beobachten war. Trotz der beobachteten Defizite bildeten die *myb21*-Mutanten im Gegensatz zu *jai1-1* nach der Handbestäubung mit Wildtyp- oder eigenen Pollen (aus geöffneten Blüten) Samen. Damit sind die Defekte in der Entwicklung der Samenanlagen nicht so stark wie in *jai1-1*, aber die zeitliche Abstimmung in der Entwicklung der einzelnen Blütenorgane scheint grundlegend gestört zu sein. Am offensichtlichsten war dabei die weitaus stärker ausgeprägte, unvollkommene Blütenöffnung in *myb21-2* im Vergleich zu *jai1-1*-Blüten, was auf JA-unabhängige Funktionen von MYB21 in der Kronblattentwicklung hinweist. Auch in *A. thaliana* wirkt AtMYB21 in den Kronblättern überwiegend unabhängig von JA, da *Atmyb21* stärkere Defekte im Wachstum und der Öffnung der Kronblätter als *aos-2* oder *coi1-1* zeigt (Reeves et al., 2012).

3.2.3.2 Regulierung der Genexpression durch MYB21

Um detailliertere Informationen über JA- und MYB21-vermittelte Regulierungsmechanismen innerhalb der Fruchtblattentwicklung von Tomate zu erhalten, wurden vergleichende Transkriptomanalysen zwischen Wildtyp-, *jai1-1*- und *myb21-2*-Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 durchgeführt.

Dabei zeigten sich einige JA- und MYB21-regulierte Gene, die möglicherweise eine verfrühte, unkontrollierte Fruchtbildung in der Tomatenblüte verhindern. Beispielsweise ist der TF *FSM1* in beiden Mutanten herunterreguliert (Abb. 52). Er ist ein MYB-ähnlicher TF, der spezifisch in Kronblättern und im Fruchtknoten der Blüte, aber vor allem zum Zeitpunkt der frühen Fruchtentwicklung exprimiert ist (Barg et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass er dabei in die Hemmung der Zellelongation involviert ist (Machemer et al., 2011). Auch wenn das Transkriptlevel an *FSM1* im Fruchtblatt des Wildtyps zwei/ drei Tage vor Anthese (Stadium 3) noch verhältnismäßig niedrig ist (Abb. 53), tragen wahrscheinlich bereits geringe Proteinmengen zur Hemmung eines unkontrollierten Wachstums des Fruchtknotens bei. Diese Regulierung fehlte in den Fruchtblättern der *jai1-1*- und *myb21-2*-Mutanten.

Ein weiteres in beiden Mutanten herunterreguliertes Gen kodiert für einen bHLH-TF, der ortholog zu *AtBIGPETALp* in *A. thaliana* ist (Abb. 52). Ihm wird eine entscheidende Rolle in der Determinierung der Petalgröße in *A. thaliana* zugeschrieben (Szécsi et al., 2006). Er ist eine durch JA regulierte Splicevariante von *AtBIGPETAL* und wird hauptsächlich in den Kronblättern exprimiert (Brioudes et al., 2009). In *A. thaliana* interagiert BIGPETALp mit ARF8 und beide agieren synergistisch um in frühen Blütenstadien mitotisches Wachstum und später die Zellexpansion in den Kronblättern zu limitieren (Varaud et al., 2011; Szécsi et al., 2006). In Tomate sind die Splicevarianten und ihre Regulierung nicht bekannt. In *A. thaliana* ist JA nötig um die für die genannten Prozesse aktive Form

(Splicevariante) des TF zu exprimieren. Die Daten hier lassen auf eine JA-abhängige generelle Expression des TF in Tomate schließen, da er in den Mutanten mit niedrigen JA-Gehalten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 37 und 46) herunterreguliert war. Über eine Vermittlung durch MYB21 lässt sich nur spekulieren. Die im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Expression korreliert mit der Bildung größerer Fruchtblätter in *jai1-1* und *myb21-2* im Stadium 3 (Anhang Abb. 1). Dies könnte auf eine zu *A. thaliana* vergleichbare Funktion im Hinblick auf die Determinierung von Zellgrößen hindeuten. Diese putative Funktion bezieht sich allerdings auf die Zellen des Fruchtblattes. Die Kronblätter wurden nicht untersucht. Interessanterweise wies der bHLH-TF einen zu *MYB21* ähnlichen Expressionsverlauf innerhalb der Blütenentwicklung im Fruchtblatt des Wildtyps auf (Abb. 53). Aus *A. thaliana* ist die Komplexbildung von MYB- mit bHLH-TFs bekannt. Beispielsweise bilden das WD-40-Protein TRANSPARENT TESTA GLABRA1, der bHLH-TF GLABRA3 und MYB23 einen Komplex, welcher durch einen GA- und JA-*cross-talk* an der Trichombildung in *A. thaliana* beteiligt ist (Qi et al., 2014). Des Weiteren bilden MYB21 und MYB24 einen Komplex mit den redundant wirkenden bHLH-TFs MYC2, MYC3, MYC4 und MYC5, wodurch die JA-vermittelte Regulierung der Stamenentwicklung in *A. thaliana* gesteuert wird (Qi et al., 2015; Chen et al., 2016b; Figueroa et al., 2015). Aufgrund dessen sollte eine mögliche Interaktion des *AtBIGPETALp*-Orthologen Tomaten-bHLH-TF mit MYB21 getestet werden.

Die Transkriptomdaten zeigten außerdem die Expression von *MYB24* im Fruchtblatt des Wildtyps im Blütenstadium 3, die in *jai1-1* und *myb21-2* fast komplett ausblieb. In *A. thaliana* zeigt *Atmyb24* keinen veränderten Blütenphänotyp, die Doppelmutante *Atmyb21 myb24* allerdings eine Verstärkung der Defekte in der Staubblattentwicklung (Mandaokar und Browse, 2009). Daher wird von redundanten Funktionen ausgegangen, wobei *AtMYB21* jedoch als Hauptregulator betrachtet wird. Allerdings führt eine starke Überexpression von *AtMYB24* vergleichbar zu *AtMYB21*-Überexpressionen zur Bildung abnormaler Pollen und einer fehlenden Antherendehiszenz (Yang et al., 2007). Weiterhin zeigten Huang et al. (2017), dass diese männliche Sterilität nur bei der Überexpression des N-Terminus (nicht des C-Terminus) von *AtMYB24* auftritt. Dies ist die Region der Interaktion mit JAZ-Proteinen und der DNA-Bindung, wohingegen eine Interaktion mit *AtMYB21* auch am C-Terminus möglich ist (Huang et al., 2017). All dies zeigt die neben *AtMYB21* ebenso wichtige Funktion von *AtMYB24* in der Staubblattentwicklung in *A. thaliana*. Im Tomatenfruchtblatt des Wildtyps ist die Expression von *MYB21* weitaus höher als jene von *MYB24*. Dennoch kann allein davon noch nicht auf eine „MYB21-Dominanz“ innerhalb der Fruchtblattentwicklung geschlossen werden. Im Verlauf der Entwicklung von Stadium 1 zu 6 erreichte *MYB24* sein Expressionsmaximum um ein Stadium versetzt zu *MYB21* in der sich bereits öffnenden Blüte (Abb. 53). Abgesehen

davon war der Expressionsverlauf der beiden MYB-TFs ähnlich. Dies könnte darauf hindeuten, dass *MYB21* die Expression von *MYB24* aktiviert. Außerdem sollte eine mögliche Komplexbildung von MYB21 mit MYB24 getestet werden. Die Analysen der TILLING-Linien von *MYB21* zeigten, dass nur ein Austausch einer hoch konservierten Aminosäure in den *N*-terminalen MYB-Domänen zu einem Blütenphänotyp und damit zum Funktionsverlust von MYB21 führte (Abb. 33 und 34). Der Grund dafür war somit evtl. eher der Verlust der Fähigkeit an DNA als an Interaktionspartner zu binden. All dies kann noch nicht klären, ob MYB21 im Vergleich zu MYB24 der wichtigere Regulator ist oder dies nur aufgrund seiner putativen Funktion in der Aktivierung der Expression von *MYB24* den Anschein hat. In *A. thaliana* sind AtMYB21 und AtMYB24 (sowie AtMYB57) aufgrund der Aminosäuresequenzähnlichkeit phylogenetisch eng verwandt, während sich MYB21 aus Tomate nicht mit anderen MYB-Faktoren gruppiert (Niwa et al., 2018). Dies kann auf weniger redundante Funktionen von MYB21 und MYB24 in Tomate hinweisen.

Chromatin-Immuno-Precipitation DNA-Sequencing (ChIP-Seq)-Analysen könnten weiterführende Erkenntnisse hinsichtlich der Identifizierung von Promoter-Sequenzen, an denen MYB21 bzw. MYB24 binden, liefern.

3.2.3.3 Einfluss von MYB21 auf die Auxin-Signalwirkung

Neben einzelnen TFs waren in *jai1-1*- und *myb21-2*-Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 laut GO-Analysen Gengruppen der Auxin- und GA-vermittelten Signalwege überrepräsentiert (Abb. 54 und 56). Beide Phytohormone sind durch ihre essentielle Rolle im Übergang von der Blüten- zur Fruchtentwicklung bekannt. So steigt neben dem Auxin- auch der GA-Gehalt in den Samenanlagen nach der Befruchtung deutlich an (Bohner et al., 1988; Gillaspay et al., 1993; Fos et al., 2000; Larsson et al., 2017). Außerdem führen exogene Hormonbehandlungen zur Bildung samenloser Früchte (Crane et al., 1964; Alabadí et al., 1996; Serrani et al., 2007; Pandolfini et al., 2007). Die sogenannte Parthenokarpie entsteht i.d.R. durch fehlende Bestäubung; Bestäubung, die nicht zur Befruchtung führt (tote oder inkompatible Pollen) oder erfolgreiche Bestäubung mit einer Abortion des Embryos (Gillaspay et al., 1993).

In der Blütenentwicklung in *A. thaliana* induzieren Auxine JA und AtMYB21 mit AtARF6 und AtARF8 als Hauptregulatoren (Reeves et al., 2012). Eine MeJA-Behandlung der *Atarf6 arf8*-Doppelmutante kann die *MYB21*-Expressionslevel jedoch nicht auf Wildtyp-Level bringen, was eine zusätzliche, direkte Regulation der Expression von *MYB21* und *MYB24* durch ARFs nahelegt (Reeves et al., 2012). Sowohl in *Atarf6 arf8* als auch in *Atmyb21-5 myb24-5* ließen sich zahlreiche Auxin-regulierte Gene (insbesondere *Small-Auxin-Up-Regulated-RNAs* und Aux/IAAs) finden, die herunterreguliert waren und somit

Zielgene der vier TFs darstellen könnten. Reeves et al. (2012) postulieren daher eine positive Rückkopplung der beiden MYB-Faktoren auf die Aktivität von AtARF6 und AtARF8 in *A. thaliana*. In der Tomatenmutante *myb21-2* waren Auxin-assoziierte Gene sowohl hoch- als auch herunterreguliert. Zahlreiche Gene, die für ARFs und Aux/IAAs kodieren, waren allerdings hochreguliert, weshalb im Gegensatz zu *A. thaliana* eher auf eine negative Rückkopplung von MYB21 auf die Aktivität der ARFs im Tomatenfruchtblatt geschlossen werden kann.

Für einige der in *jai1-1* und *myb21-2* im Vergleich zum Wildtyp hochregulierten ARFs sind Funktionen während der Fruchtbildung in Tomate bekannt sind. So waren die für ARF5 und ARF7 kodierenden Gene überexprimiert. Diese TFs besitzen eine Funktion in der Hemmung der Fruchtbildung, da *knock-down*-Linien parthenokarpe Früchte bilden (Liu et al., 2017; de Jong et al., 2009). ARF7 reguliert zum Teil eine weiterführende Auxin-Signalwirkung wie die Expression von *ARF5* und *IAA14*, deren Transkripte in einer *ARF7-RNAi*-Linie reduziert sind (de Jong et al., 2011; Hu et al., 2018). Allerdings zeigte die vorliegende Arbeit eine Hochregulierung der beiden ARFs und auch von *IAA14*, aber dennoch die Bildung parthenokarper Früchte in *jai1-1* und *myb21-2*. Einerseits könnte sich die Funktion der beiden TFs drei Tage vor einer möglichen Befruchtung von jener zum Zeitpunkt der Anthese unterscheiden. Andererseits ist die genannte Rolle während der Fruchttinitiation bereits zwischen unterschiedlichen Studien widersprüchlich. So löst auch die Herunterregulation von *IAA9*, welcher einen Repressor für ARF7 darstellt, die Fruchtbildung vor der Befruchtung aus (Wang et al., 2009). Vergleichbar zu *MYB21* scheinen damit sowohl zu hohe als auch zu niedrige *ARF7*-Transkriptmengen ähnliche Defekte auszulösen. Für eine koordinierte Blüten- und Fruchtentwicklung verlangt es demnach eine präzise Regulierung der ARF-Expression. Zudem kann von einem erhöhten *ARF7*-Transkriptlevel noch nicht auf eine erhöhte Aktivität als transkriptioneller Aktivator ausgegangen werden. Seine Aktivität wird neben der Komplexbildung mit *IAA9* auch durch die Interaktion mit dem DELLA-Protein bestimmt (Hu et al., 2018). DELLA und der ARF7/*IAA9*-Komplex regulieren gemeinsame *downstream* Gene, die die Auxin- und GA-abhängige Fruchttinitiation kontrollieren.

ARF9A-Transkripte liegen ebenfalls in einer größeren Menge in den Mutanten vor. Er ist ein Repressor-ARF und beeinflusst die Zellteilung während des frühen Fruchtwachstums negativ. Er wird durch die Befruchtung als auch durch Auxin-Behandlung von unbefruchteten Samenanlagen induziert (de Jong et al., 2015). Hohe Transkriptmengen in Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 zeigten somit eine deutlich verfrühte, befruchtungsunabhängige Funktion von *ARF9A* in *jai1-1* und *myb21-2*. Weiterhin ließ sich in den Mutanten die Überexpression der Repressoren *ARF2a* und *ARF2b* nachweisen. Die beiden ARF2-Paralogen sind als positive Regulatoren der Fruchtreifung

bekannt (Hao et al., 2015). Damit waren in Fruchtblättern der *jai1-1* und *myb21-2* sowohl ARF-Aktivatoren als auch –Repressoren dereguliert, was auf eine sehr komplexe Auxin-Signalvermittlung innerhalb der Blütenentwicklung hinweist. Außerdem lässt die Hochregulierung von sowohl ARFs als auch Aux/IAAs keine geradlinigen Schlüsse zur Auxin-Signalkaskade zu, da Aux/IAAs ARF-Repressoren darstellen und unter Vorhandensein von Auxin degradiert werden. Möglicherweise binden die hier hochregulierten Aux/IAAs nicht an die besagten ARFs. Hinzu kommt, dass die meisten Aux/IAAs sehr kurzlebig sind und aufgrund ihrer Auxin-abhängigen Expression als auch Degradation einer hohen Fluktuation unterliegen (Dreher et al., 2006). Zusammengefasst lässt sich eine Fehlregulierung der Auxin-Signalvermittlung in den Fruchtblättern der noch ungeöffneten Knospe in *jai1-1* und *myb21-2* feststellen. Der detaillierte Mechanismus muss jedoch noch aufgeklärt werden.

3.2.3.4 Einfluss von JA und MYB21 auf die GA-Signalwirkung

In der Blütenentwicklung von *A. thaliana* wirkt GA wie die Auxine *upstream* der Expression der MYB-Faktoren, da die GA-Biosynthesemutante *ga1-3* kurze Filamente und niedrige *AtMYB21*, *AtMYB24* und *AtMYB57* Transkriptlevel aufweist (Cheng et al., 2009).

Laut der vorliegenden Daten aus Tomate erfolgte eine signifikante Hochregulierung der *GA 20-Oxidase-1* und *-3* sowie einer *GA 3- β -Hydroxylase* als auch einer *GA 2-Oxidase*, die die GA-Inaktivierung katalysiert, im Gynoeceum der noch geschlossenen Knospe in *jai1-1* und *myb21-2* (Abb. 56; Anhang Tab. 10). Dies könnte im Gegensatz zu *A. thaliana* auf eine hemmende Wirkung von JA und MYB21 auf die GA-Signalwirkung hinweisen. Die Expression der *GA 20-Oxidase 3* ist in *jai1-1* und *myb21-2* deutlich verfrüht, da im Wildtyp erst in der seneszenten Blüte kurz vor dem Beginn der Vergrößerung des Fruchtblattes ihre RNA nachweisbar ist (Rebers et al., 1999).

In Tomate beschreibt der C13-Hydroxylierungsweg den vorrangigen GA-Biosyntheseweg (Abb. 9; Garcia-Hurtada et al., 2012). Der Vorläufer GA_{53} lässt sich in beiden Mutanten in signifikant höheren Mengen als im Wildtyp nachweisen (Abb. 58). Anhand der fehlregulierten Expression der für die GA-Biosynthese kodierenden Gene ließ sich allerdings nur die Überexpression der *GA 20-Oxidasen* auch mit erhöhten Gehalten an GA_{44} und GA_{19} in *jai1-1* und nur GA_{19} in *myb21-2* korrelieren. Die bioaktive Form GA_1 , welche durch die *GA 3- β -Hydroxylase* katalysiert wird, zeigte keine veränderten Gehalte. Grundsätzlich kann allein von hohen Transkriptleveln der *GA 20-Oxidasen* nicht auf hohe Hormongehalte geschlossen werden. Die Expression einiger *GA 20-Oxidasen* wird zwar durch bioaktive GAs reguliert. Dabei kommt es allerdings zu

einer Abnahme der basal hohen Transkriptlevel unter GA-Einwirkung (Rieu et al., 2008; Hu et al., 2018).

Garcia-Hurtada et al. (2012) postulieren, dass die Überexpression der *GA 20-Oxidasen* in Tomate den Metabolismus hin zum Syntheseweg ohne die C13-Hydroxylierung verschiebt. Ein erhöhter GA₄-Gehalt in den Samenanlagen führte in ihren Experimenten zu einem höheren Ertrag und einer unvollständigen Parthenokarpie. In *jai1-1*-Fruchtblättern ließen sich tatsächlich erhöhte Werte von GA₉ und auch der bioaktiven Form GA₄ detektieren (Abb. 58). In der Mutante war der GA-Umsatz generell verstärkt, da auch die inaktiven Formen GA₈ und GA₃₄ in signifikant höheren Mengen vorlagen. Falls die Parthenokarpie der *jai1-1* darauf zurückzuführen ist, wäre diese Fehlregulation somit unabhängig von MYB21. Die Parthenokarpie der *myb21-2* konnte im Gegensatz dazu nicht in direkten Zusammenhang mit erhöhten Gehalten an bioaktiven GAs gebracht werden.

In *A. thaliana* wirken Auxine zum Teil durch die Initiierung der Expression von *GA 20-Oxidasen upstream* von GAs und deren Wirkung wird teilweise durch GAs vermittelt (Vriezen et al., 2008; Pandolfini et al., 2007; Serrani et al., 2008; de Jong et al., 2009). Auch in Tomate wurden Einflüsse der Auxin-Signalwirkung auf die Expression von GA-Biosynthesegenen gezeigt. So sind in den parthenokarpen *ARF5-knock-down*-Linien die Transkriptlevel der *GA 20-Oxidase 1* erhöht (Liu et al., 2018). In den ebenso samenlosen *ARF7-RNAi*-Linien wiederum sind die Transkriptgehalte der *GA 2-Oxidasen 2* und *4* erhöht und die GA-Gehalte stark reduziert (de Jong et al., 2011). Somit könnte die Hochregulierung einiger GA-Biosynthesegene in *jai1-1* und *myb21-2*-Fruchtblättern durch eine Fehlregulierung der Auxin-Signalvermittlung ausgelöst worden sein. Ein Indiz dafür ist die verstärkte Bildung größerer, unförmiger Früchte der *myb21-2*-Mutante. Dies deutet eher auf eine Auxin-, anstelle einer GA-induzierten Parthenokarpie hin (Serrani et al., 2007). In weiterführenden Arbeiten sollten die Auxingehalte in den Fruchtblättern des Blütenstadiums 3 bestimmt werden.

Zusammengefasst mit phänotypischen Merkmalen wie der verfrühten Nucellus-Degenerierung kommt es in *jai1-1* und *myb21-2* wahrscheinlich zu einer fehlerhaften Regulierung der Auxin- und GA-vermittelten Fruchthinitiierung zumindest teilweise durch ein Fehlen der JA-vermittelten Wirkung von MYB21 im Fruchtblatt vor dem Zeitpunkt der Befruchtung.

3.2.3.5 Model zur Funktion von MYB21 in der Blütenentwicklung von Tomate

Aus der vorliegenden Arbeit lässt sich ein hypothetisches Model zur Funktion von MYB21 in der Entwicklung der Tomatenblüte ableiten (Abb. 59). Nach der Initiierung der Blütenentwicklung lösen bestimmte Entwicklungseinflüsse die Biosynthese von JA und

JA-Ile im Gynoeceum aus, deren Gehalte im Blütenstadium 3 ihren Höhepunkt erreichen. JA-Ile vermittelt die Expression von *MYB21*, die in anderen Blütenorganen (Kronblätter) zum Teil auch JA-unabhängig erfolgt. Der TF wirkt wiederum positiv auf die JA-Biosynthese. Zudem initiiert er zusammen mit weiteren JA-regulierten Genen die Expression von Genen, die in der Entwicklung der Samenanlagen (wie der Hemmung der verfrühten Nucellus-Seneszenz) wirken. Außerdem reguliert er Gene, die an der Determinierung der Zellgrößen in den Organen der gesamten Knospe beteiligt sind und damit die synchrone Entwicklung aller Blütenteile sicherstellen. Des Weiteren hemmt *MYB21* im Gynoeceum vor der Blütenöffnung die GA- und Auxin-Signalwirkung, welche die Fruchtbildung auslöst (wie beispielsweise die Expression von *ARF5*, *ARF7* und *ARF9A*). Damit kann erst nach erfolgter Befruchtung bei niedrigen *MYB21*-Transkriptgehalten und der *MYB21*-Reprimierung durch *JAZ9* die Entwicklung zur Frucht durch die Wirkung von Auxinen und GAs beginnen.

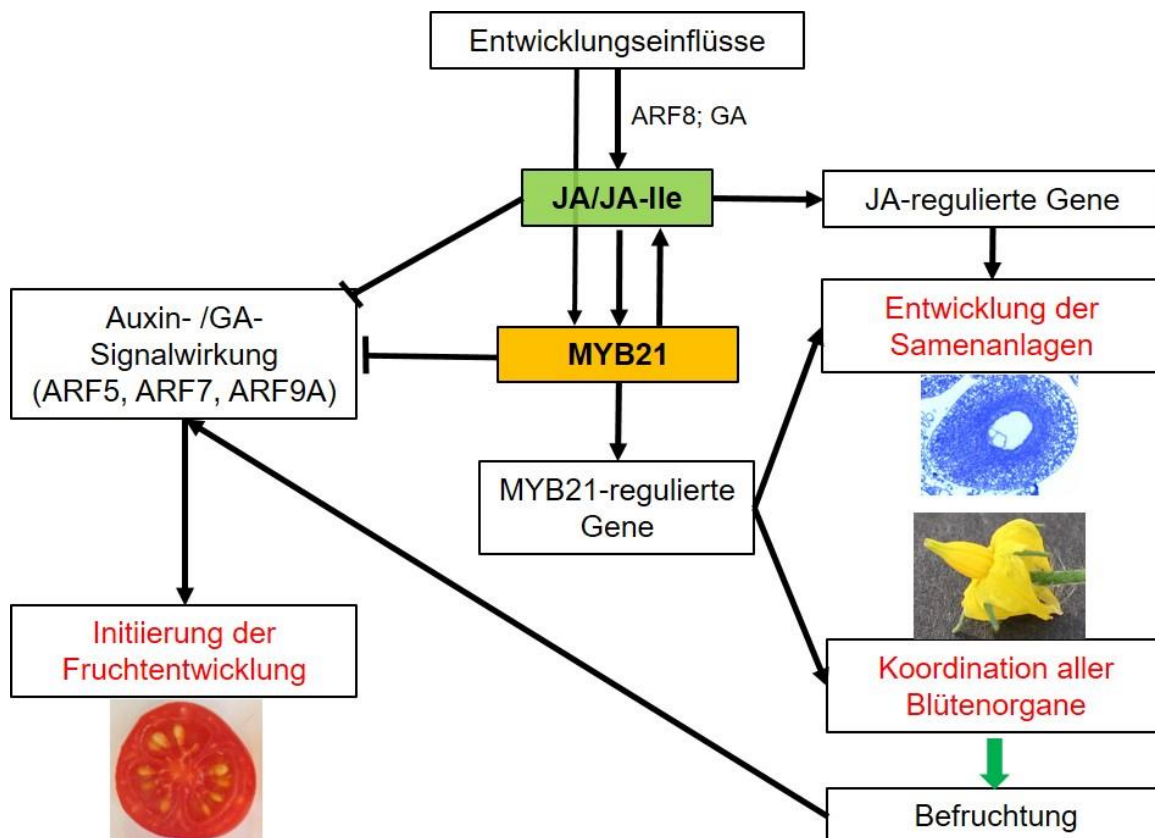


Abb. 59: Hypothetisches Model zur Funktion von *MYB21* in der Blütenentwicklung von Tomate

4 Zusammenfassung

Das Weiterbestehen von Angiospermen hängt von einer funktionierenden Blütenentwicklung, Befruchtung und Bildung von Samen enthaltenden Früchten ab. Diese Prozesse verlangen eine präzise Regulation sowie spezifische Koordination innerhalb und zwischen den einzelnen Blütenorganen, welche durch Phytohormone gesteuert werden. Darunter sind die Jasmonate (JAs), die in der Ausbildung der Fertilität zahlreicher Pflanzenarten eine wichtige Rolle spielen. Die *jasmonate-insensitive1-1 (jai1-1)*-Mutante in Tomate ist im Gegensatz zur *coronatine-insensitive1 (coi1)* in *A. thaliana* weiblich steril.

jai1-1 ist zwar männlich fertil, weist allerdings eine deutlich geringere Anzahl an vitalen Pollen, eine verfrühte Antherendehiszenz und Pollenausschüttung im Vergleich zum Wildtyp auf. In Vorarbeiten wurde eine JA-Funktion in der Hemmung einer verfrühten Ethylen-Signalwirkung in den späten Stadien der Staubblattentwicklung postuliert. Die vorliegende Arbeit sollte dazu mittels der Doppelmutante *jai1-1 Never ripe* den funktionellen Beweis erbringen. In der Tat konnte eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps hinsichtlich des Wassergehaltes des Staubblattes der offenen Blüte und des Zeitpunktes des Stomiumrisses, welcher die Pollenausschüttung nach sich zieht, gezeigt werden. Die Identifikation von regulatorischen Genen blieb allerdings erfolglos.

Der Hauptteil der Arbeit bestand jedoch in der Untersuchung der JA-Funktion im Fruchtblatt. Dabei wurde sich auf die beiden Transkriptionsfaktoren (TFs) MYB14 und MYB21 konzentriert, deren Gene in Wildtyp-Samenanlagen von großen Knospen hoch exprimiert sind und sich in *jai1-1* kaum Transkripte nachweisen lassen. Beide TFs konnten im Zellkern lokalisiert und transkriptionelle Aktivität von MYB21 in Hefe nachgewiesen werden. AtMYB21 ist bereits für seine zentrale Rolle in der Staubblattentwicklung von *A. thaliana* bekannt. Transformationsexperimente zeigten, dass MYB21 aus Tomate und *A. thaliana* zueinander funktional ortholog sind. Des Weiteren interagiert SIMYB21 wie AtMYB21 mit SIJAZ-Proteinen. Biologisch relevant ist wahrscheinlich die Interaktion mit SIJAZ9.

Unter dem Test drei verschiedener Promoter ließ sich keine Überexpression von MYB14 und MYB21 im Fruchtblatt von Tomate erreichen. Zur funktionellen Charakterisierung der beiden MYB-TFs dienten daher identifizierte bzw. generierte *loss-of-function*-Linien. Dabei wiesen TILLING-Linien und generierte CRISPR/Cas9-Mutanten von MYB14 keinen zum Wildtyp veränderten Blütenphänotyp auf.

Dagegen zeigte eine TILLING-Linie (*myb21-1*) eine unvollständige Blütenöffnung und kaum Fruchtbildung. Zwei unabhängige CRISPR/Cas9-*loss-of-function*-Linien (*myb21-2* und *myb21-3*) wiesen ähnliche Defekte in der Blütenöffnung auf und bildeten

ausnahmslos samenlose Früchte. In allen *loss-of-function*-Linien trat eine verfrühte Degenerierung des Nucellus' auf. Außerdem waren die Gehalte an JA und JA-Ile im Fruchtblatt der großen Knospe in den *myb21*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp um die Hälfte reduziert. Dies legt einen positiven Rückkopplungsmechanismus von MYB21 auf die JA-Biosynthese im Tomatengynoeceum nahe. Vergleichende Transkriptomdaten im gleichen Gewebe von Wildtyp, *jai1-1* und *myb21-2* zeigten zahlreiche ARFs und AUX/IAAs kodierende sowie GA-Biosynthesegene, die in beiden Mutanten hochreguliert waren. Sowohl Auxine als auch GAs sind als die Hauptregulatoren der Fruchtinittierung bekannt. Die Gehalte an bioaktiven GAs im Fruchtblatt der großen Knospe waren in *jai1-1* und *myb21-2* im Vergleich zum Wildtyp allerdings nicht nennenswert dereguliert. Des Weiteren waren Gene, die an der Limitierung der Zellgröße beteiligt sind, in *jai1-1* und *myb21-2* herunterreguliert. All dies lässt eine JA-vermittelte Funktion von MYB21 in der Hemmung von Fruchtbildungsprozessen bis zum Zeitpunkt der Befruchtung im Fruchtblatt der Tomate vermuten. Die zusätzliche Einschränkung der Blütenöffnung in den *myb21*-Mutanten lässt eine zentrale, teilweise JA-unabhängige Rolle von MYB21 in der zeitlichen und räumlichen Koordination von Entwicklungsprozessen innerhalb der gesamten Blüte annehmen.

5 Material und Methoden

5.1 Pflanzenanzucht und Ernte

Solanum lycopersicum cv. MicroTom Wildtyp-, *jai1-1*-Pflanzen und alle in der Arbeit generierten transgenen Tomatenpflanzen wurden in der Phytokammer unter Langtagbedingungen bei einer relativen Luftfeuchte von 70 % mit 26 °C am Tag bei einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ und 20 °C nachts angezogen. Die TLLING-Linien sowie *A. thaliana* cv. Columbia Wildtyp-, *myb21-5*-Pflanzen und die hier generierten transgenen *A. thaliana*- Linien wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen kultiviert.

Die Ernte der Frucht- bzw. Staubblätter der Tomatenpflanzen begann jeweils ab dem Blühbeginn der ersten oder zweiten Infloreszenz. Für qPCR-Analysen erfolgte die Ernte 7 h nach Beginn der Lichtperiode innerhalb 1 h und für Phytohormonbestimmungen innerhalb von 2 h. Die Proben wurden sofort auf Trockeneis überführt und bei -80 °C gelagert.

Für die Emaskulationsexperimente wurden die Kronblätter und die verwachsene Staubblattkrone von Blüten des Stadiums 4 (Abb. 2) entfernt. Für Kreuzungen wurde darauffolgend zusätzlich das Stigma mit Pollen aus aufgerissenen Antheren von geöffneten Blüten bestäubt.

5.2 Molekularbiologische Arbeiten

5.2.1 Genotypisierung der Tomaten-Mutanten *Nr*, *jai1-1* und *myb21*

Die Selektion der *Nr*-Mutation erfolgte durch die Keimung auf Phytoagar mit 200 μM 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC). Keimlinge, die nach 12 Tagen keinen *triple response* aufwiesen, enthielten das *Nr*-Allel. Sobald alle Nachkommen einer Linie keine Sensitivität gegenüber ACC zeigten, wurde von einer *Nr*-homozygoten Linie ausgegangen.

Die Genotypisierung aller anderen Mutanten erfolgte mittels PCR (alle Primersequenzen Anhang Tab. 4 und 8). Alle PCRs erfolgten nach Herstellerangaben mit dem Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific). Hierbei diente ein 0,3 mm großes Stückchen eines Keim- oder jungen Blattes als DNA-Vorlage, welches direkt in den PCR-Mix gegeben wurde. Die PCRs liefen jeweils im Thermocycler C1000 Touch (Bio-Rad) laut dem „3-Schritte-Protokoll“ mit der Initialisierung der Taq- Polymerase für 5 min bei 98 °C, gefolgt von 35 Zyklen:

5 s	98°C	Denaturierung
5 s	**	Anlagerung
20 s	72°C	Extension.

** Folgende Anlagerungstemperaturen dienten zur Identifikation der folgenden Mutanten:

<i>jai1-1</i> :	62 °C
<i>TOMJPEW3551/ 2998</i>	54 °C
<i>TOMJPE7979</i> :	53,8 °C
<i>TOMJPE8245</i> :	50,3 °C
<i>myb21-1</i> :	50,3 °C
<i>myb14-CRISPR</i>	58 °C
<i>Cas9, myb21-2, myb21-3</i> :	62 °C
Überexpressionslinien:	55 °C.

Für die Identifizierung der *jai1-1*-Pflanzen wurden drei spezifische Primer für das Gen *COI1* verwendet. Dabei bindet der *reverse* Primer im ersten Intron des Gens, welches in beiden Genotypen vorliegt. In Kombination mit Primer *COI1_WT_for*, der in einer Sequenz bindet, die im *jai1-1*-Allel deletiert ist, entsteht nur bei Vorhandensein des Wildtyp-Allels ein 525 bp großes Fragment. Ein spezifisches Fragment (777 bp) für das *jai1-1*-Allel wird in Kombination mit Primer *COI1_jai1_for* amplifiziert, der *downstream* der Deletion bindet (Li et al., 2004). Für die PCR wurden alle drei Primer in einen 20 µl-Reaktionsansatz gegeben. Mittels einer einzigen PCR gefolgt von einer Gel-Elektrophorese war somit die Detektion von Wildtyp-, *jai1-1*- beziehungsweise heterozygoten Pflanzen möglich.

Die TILLING-Mutanten wurden aus Screens der ca. 9000 EMS-mutagenisierten Linien der MicroTom-TILLING-Population durch Dr. Yoshihiro Okabe und Prof. Hiroshi Ezura zur Verfügung gestellt (Okabe et al., 2011). Dabei wurde für *MYB14* in dessen gesamter genomischen Sequenz und für *MYB21* in den ersten 606 bp der genomischen Sequenz nach Mutationen gesucht. Nach Erhalt wurden die TILLING-Mutanten unter Verwendung von CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequences*)-Markern genotypisiert. Dazu wurde jeweils 10 µl PCR-Ansatz (PCR siehe unten) mit 16 µl Wasser, 2 µl 10xPuffer und 1 µl Restriktionsenzym (NEB) über Nacht bei 37°C verdaut und per Gel-Elektrophorese analysiert. Für die *myb14*-Linien *TOMJPEW3551* und *TOMJPEW2998* wurde *ApoI* für den Verdau verwendet (146 bp und 680 bp sowie 410 bp und 416 bp in der Mutante). Für die *myb21*-Linie *TOMJPE7979* erfolgte die Restriktion mit *HphI* (109 und 122 bp im Wildtyp) und im Fall von *myb21-1* mit *Eco31I* (405 und 383 bp im Wildtyp). Die Linie *TOMJPE8245* ließ sich nur mittels *High-Resolution-Melt-Curve* qPCR identifizieren.

Dazu wurde jeweils 30 ng DNA und je 2 μ M Primer eingesetzt und folgendes Protokoll zur Amplifikation des 152 bp großen PCR-Produktes:

15 min	95 °C	} 40 Zyklen
15 s	95 °C	
10 s	60 °C	
20 s	72 °C	
1 min	95 °C	
1 min	60 °C	

mit anschließender Detektion der Fluoreszenz für jeweils 10 s aller 0,1 °C zwischen 60 und 90 °C zur detaillierten Darstellung der Schmelzkurve verwendet.

Die Primärtransformanten sowie die T₁ der CRISPR/Cas9-Experimente für einen *MYB14*- bzw. *MYB21-loss-of-function* wurden zunächst mit Cas9-spezifischen Primern, die ein 500 bp großes PCR-Produkt amplifizieren, getestet. Zur Bestimmung einer Mutation in *MYB21* und später der *myb21-2*- und *myb21-3*-Mutanten fanden spezifische Primer Verwendung, die das erste bzw. zweite Exon von *MYB21* flankieren und jeweils ein 500 bp großes Fragment amplifizieren. Da es sich bei den Mutanten (Exon 2) um die Deletion bzw. Hinzufügung eines einzelnen Basenpaares handelt, war die Sequenzierung des PCR-Produktes nötig. Gleiches galt für die Detektion von Mutationen im ersten Exon von *MYB14*. Dazu erfolgte erst die Reinigung mittels SureClean Plus Kit (Bioline) ohne pinken Co-Präzipitant oder NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kit (Machery & Nagel) nach Herstellerangaben. Das PCR-Fragment wurde in 25 μ l Wasser gelöst und 5 ng/ μ l in 15 μ l (mit Wasser aufgefüllt) mit zusätzlichen 2 μ l vorwärts-Primer zur Sequenzierung durch die Firma Eurofins eingeschickt.

Die stabilen *MYB14*- und *MYB21*-Überexpressionslinien sowie der *myb21-2*-Komplementationsversuch wurden jeweils unter Verwendung eines Primers spezifisch für das Gen und des zweiten Primers spezifisch für den OCS-Terminator, den 35S-Promoter oder den *Flag*-Tag der Expressionskassette auf Vorhandensein der Insertion geprüft.

Für einen Teil der Genotypisierungen (*Cel1pro*-Konstrukte, *Flag*-Nachweis) war die Isolation von genomischer DNA nötig, die laut Protokoll mit dem NucleoSpin Plant II Kit (Machery & Nagel) durchgeführt wurde. Dazu wurden jeweils zwei Fiederblättchen in flüssigem Stickstoff geerntet, per Kugelmühle homogenisiert und komplett für die Isolierung nach Herstellerangaben eingesetzt. Die PCR erfolgte mit der Taq-Polymerase (Bio&Sell):

2 µl	B-Puffer (10x)
2 µl	MgCl ₂ (10x)
2 µl	Lösung S (10x)
0,5 µl	dNTPs
je 0,5 µl	Primer (10µM)
0,5 µl	Taq-Polymerase
0,5 µl	DNA

mit Wasser auf 20µl aufgefüllt;

mit einer Amplifikation des PCR-Produktes im Thermocycler C1000 Touch (Bio-Rad):

2 min	94 °C	} 40 Zyklen
30 s	94 °C	
30 s	55 °C	
1 min/ kb	72 °C	
5 min	72 °C.	

5.2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Isolierung von RNA erfolgte mit gefrorenem, in der Regel mittels Kugelmühle homogenisiertem Pflanzenmaterial unter Verwendung des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen) laut Herstellerangaben ohne DNase-Behandlung auf der Säule und mit einer einmaligen Eluierung mit 30 µl Wasser. Die DNA wurde anschließend mittels DNA-free™ Kit (Thermo Scientific) laut Protokoll zur Routine-DNase-Behandlung (< 200 ng RNA) entfernt. Unter Verwendung von mindestens 200 ng RNA wurde mittels Gelelektrophorese oder Kapillarelektrophorese laut Herstellerangaben des QIAxcel Advanced Systems (Qiagen) die RNA-Integrität durch das Vorhandensein der Banden für die 28S-, 18S- und 5S-rRNA überprüft.

Bis zu 1 µg RNA wurde zur cDNA-Synthese mithilfe des ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) laut Herstellerangaben unter Verwendung von oligo(dT)-Primern eingesetzt.

5.2.3 qPCR-Analysen

Verdünnte cDNA wurde wie folgt für einen qPCR-Reaktionsansatz eingesetzt:

2 µl	5x EvaGreen QPCR Mix II (ohne ROX; Bio&Sell)
je 1 µl	vorwärts- und rückwärts-Primer (2 µM)
mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt,	

und unter folgendem Protokoll die Amplifikation im CFX Connect (Bio-Rad) durchgeführt:

15 min	95 °C
--------	-------

40 Zyklen 15 s 95 °C
 30 s 56 °C

mit der anschließenden Generierung der Schmelzkurve durch die Detektion der Fluoreszenz zwischen 60 °C und 95 °C für jeweils 1 s aller 0,5 °C.

Alle qPCR-Primer (Anhang Tab. 5) wurden mithilfe der Software „PrimerFox“ und „Primer3“ auf Grundlage des Tomatengenoms in Genebank (NCBI) oder der „Tomato Genomic Resources Database“ (Suresh et al., 2014) unter folgenden Gesichtspunkten ausgewählt: 20 bp-Länge, 50 – 100 bp großes PCR-Produkt, mindestens 1 G bzw C am 3'-Ende, 59 °C Schmelztemperatur. Die Spezifität innerhalb des Tomatengenoms wurde mittels BLAST (NCBI) überprüft. Selbstanlagerung und Hairpin-Formation wurden mittels „<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>“ ausgeschlossen.

Die Genexpression wurde mittels delta-Cq-Methode (Pfaffl, 2004) relativ zum Referenzgen *TIP41* (*Solyc10g049850*; Expósito-Rodríguez et al., 2008) entsprechend $2^{-\Delta Cq}$ ermittelt (wobei $\Delta Cq = Cq_{Zielgen} - Cq_{Referenzgen}$).

5.2.4 Analyse der Genexpression mittels FLUIDIGM

Das Biomark HD System (Fluidigm) mit *Dynamic Array IFC (integrated fluidic circuits)* ist ein äußerst sensitives, Hochdurchsatz-qPCR-System. Für die Analyse der Expression von 47 Genen in 48 Staubblattproben wurde der *48.48 Dynamic Array Chip* (Biomark) verwendet.

RNA mit einer Konzentration von 90 ng/µl wurde zur Hersteller-spezifischen cDNA-Synthese eingesetzt (Fluidigm 5x Reverse Transcription Master Mix). Aufgrund des Einsatzes von geringen RNA-Mengen wurde eine Präamplifikation mit einem Pool aller Primer leicht abweichend vom Herstellerprotokoll mit je 2 µl pro Primerpaar (mit 50 µM pro Primer) und 104 µl DNA Suspension-Puffer für eine finale Konzentration von 500 nM durchgeführt. Alle Primer wurden zuvor mittels herkömmlicher qPCR (5.2.3) hinsichtlich ihrer Effizienz und spezifischen Amplifikation überprüft. Die Präamplifikation erfolgte im Thermocycler (Bio-Rad) mittels Touch-Down-PCR in 1 °C-Schritten von 65 °C auf 60 °C gefolgt von neun Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 60 °C. Um freie Primer zu entfernen, wurde jeweils 5 µl Präamplifikationsansatz mit Exonuclease I (NEB) laut Fluidigm-Angaben behandelt. Die Reaktionsprodukte wurden 1:5 mit TE-Puffer verdünnt und direkt zur Herstellung des Probenmixes laut Protokoll mit 2x SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX (Bio-Rad) und 20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm) genutzt. Die Primerpaar-Mixe (Assay Mix) wurden jeweils auf eine endgültige Konzentration von 5 µM unter Verwendung des doppelten Volumens der 100 µM-Stocks und dadurch einer verringerten Menge an 2x Assay Loading Reagent (Fluidigm-

Bei Problemen ein PCR-Produkt zu amplifizieren, wurde die PCR mit der KOD-Hot-Start-Polymerase (Novagen) durchgeführt:

5 µl	10 x Buffer
3 µl	25 mM MgSO ₄
5 µl	dNTPs (je 2 mM)
je 1,5 µl	Primer (10 µM)
1 µl	KOD-Hot-Start-DNA-Polymerase (1 U/µl)
2 µl	DNA-Vorlage

mit Nuklease-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

Die PCRs erfolgten mit dem jeweiligen PCR-Protokoll per Herstellerangaben im Thermocycler C1000 Touch (Bio-Rad). Die PCR-Produkte wurden mittels SureClean Plus Kit gereinigt (Bioline; siehe 5.2.1).

5.2.7 Klonierung mittels *Golden-Gate-Methode*

Das Klonieren mittels *Golden-Gate-Methode* beruht auf dem bausteinartigen Zusammensetzen einzelner Module zu Genkassetten und schließlich dem Zusammenbringen mehrerer Kassetten mithilfe von *TyplI*-Restriktionsenzymen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden (Weber et al., 2011; Werner et al., 2012). Für diese Arbeit wurden *BsaI* und *BpiI* genutzt, die folgende DNA-Sequenzen erkennen:

<i>BsaI</i> (NEB):	GGTCTC
<i>BpiI</i> (Thermo Scientific):	GAAGAC

Alle verwendeten Primer sind im Anhang Tabelle 6 gelistet.

5.2.7.1 Klonierung benötigter Module

Im Rahmen der Arbeit wurden drei Promotoren in den Vektor pICH41295 als Level 0-Modul kloniert. Als DNA-Vorlage für die PCR zur Klonierung des *LepC3*-Promoters diente das Plasmid pGPTV-KAN (Becker et al., 1992) mit den Sequenzinformationen zum Primer-Design aus Sorkina et al. (2011). Für die Klonierung der jeweils ca. 1,5 kb langen Sequenzen *upstream* des Translationsstartes von *Cel1* (*Solyc08g081620*) und *MYB21* wurde genomische DNA als Grundlage für die PCR genutzt. Aufgrund von Klonierungsproblemen wurde der *Cel1*-Promoter aus drei einzelnen PCR-Fragmenten, die jeweils mittels einer Restriktion mit *SmaI* und einer *blunt-end*-Ligation in pUC57 zwischenkloniert wurden, zusammengesetzt. Die 1,5 kb *upstream*-Sequenz des Translationsstartes von *MYB21* wurde ebenfalls aus drei PCR-Produkten, die zuerst jeweils in den Level -1 Rückgratvektor pAGM1311 kloniert wurden, zusammengefügt.

Die kodierende Sequenz von *MYB14* (*Solyc06g083900*) und *MYB21* (*Solyc02g067760*) wurde aus cDNA von Staubblättern des Blütenstadiums 1 und 3 amplifiziert. Für die

Klonierung der genomischen Sequenz der beiden Gene diente genomische DNA als Grundlage. Beide Gene wurden aufgrund einer Bsal-Restriktionsstelle aus jeweils zwei überlappenden PCR-Fragmenten direkt in den Level 0-Vektor pAGM1287 kloniert. Nur für die Klonierung der genomischen Sequenz von *MYB21* wurde das zweite Intron von 2435 bp auf 231 bp stark gekürzt, wodurch die Amplifizierung von drei PCR-Produkten nötig war. Das Stopp-Codon wurde jeweils in ein Serin-kodierendes Codon umgewandelt, was die C-terminale Fusion mit einem *Flag*- oder *GFP*-Tag ermöglichte. Folgende weitere, bereits vorhandene Klonierungsvektoren (AG Dr. Sylvestre Marillonnet) wurden für die Arbeit verwendet: pICH51266 und pAGM16831 (35S-Promoter), pICSL50007 und pICSL30005 (*Flag*), pAGT1559 (bereitgestellt von Dr. Kathleen Rothe) und pICSL30006 (*GFP*), pICH41432 (OCS-Terminator), pAGM16841 (Stopp-Codon + *NOS*-Terminator), pICSL80016 (GUS), pICH75055 (Level 1-Rückgrat), pICH41744 (Endlinker).

Für die Generierung der CRISPR/Cas9-Konstrukte wurden jeweils zwei 20 bp lange Sequenzen im ersten Exon von *MYB14* sowie eine oder zwei spezifische Sequenzen im ersten oder zweiten Exon von *MYB21* mit Hilfe der Software „CRISPRdirect“ (crispr.dbcls.jp; Naito et al., 2015) als spezifische Bindesequenzen der *single guide* RNAs (sgRNAs) ausgewählt. Die PCR-Produkte der sgRNAs wurden jeweils mit dem spezifischen Primer und einem universellen Rückwärtsprimer aus dem den unspezifischen Teil der sgRNA enthaltenden Vektor pAGM9037 amplifiziert. Somit wurde ein binärer Vektor für *MYB14* und zwei für *MYB21* erstellt, die zusätzlich jeweils eine Expressionskassette mit der kodierenden Sequenz der für Menschen optimierten *Cas9*-Endonuklease mit einer *NLS* (pICSL11021) enthielten. Jede sgRNA wurde durch den *A. thaliana U6*-Konsens-Promoter (pICSL90001) und die *Cas9* durch den 35S-Promoter reguliert.

Konstrukte für eine stabile Transformation (*Flag*-Tag) wurden mit einer zusätzlichen Kanamycinresistenz-Kassette (*NPTII*; pICH67131) in den Level 2-Vektor pAGM4673 kloniert. Das Konstrukt für den Versuch der *myb21-2*-Komplementation wurde stattdessen mit einer Hygromycinresistenz, die ebenso durch den *NOS*-Promoter (pICH87633) und –Terminator (pICH49344) kontrolliert wird, kloniert.

5.2.7.1 Restriktion und Ligation

Sowohl der Restriktionsverdau als auch die anschließende Ligation finden bei der *Golden-Gate*-Methode zeitgleich in einem Reaktionsansatz statt. Dabei wurden jeweils 40 fmol der benötigten Vektoren bzw. PCR-Produkte eingesetzt:

$$ng\ DNA = \frac{N \times 660 \frac{pg}{pmol} \times 0,04\ pmol}{1000} \quad \text{mit } N = \text{Anzahl Basenpaare}$$

...sowie

1 µl	T4-Ligase (Promega)
1 µl	Bsal oder Bpil
2 µl	10x T4-Ligase-Puffer

mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler C1000 Touch (Bio-Rad) mit folgendem Protokoll:

2 min	37°C
4 min	20°C
	x 25 oder 50 Zyklen (ab vier Fragmenten)
5 min	37°C
5 min	50°C
5 min	80°C.

5.2.8 Klonierung mittels Gateway-Methode

Die auf sequenzspezifischer Rekombination beruhende *Gateway*-Klonierung wurde zur Generierung der Hefe-Zwei-Hybrid- und BiFC-Vektoren für Interaktionsstudien verwendet (Primer Anhang Tab. 7). Dazu wurden PCRs mit cDNA von mit MeJA behandelten Tomatenblättern zur Amplifikation von *JAZ1*, *JAZ2*, *JAZ6*, *JAZ7*, *JAZ8*, *JAZ9*, *JAZ10* und *JAZ13*, von Staubblättern sowie von mit MeJA behandelten Wurzelproben zur Amplifikation von *JAZ3*, *JAZ4*, *JAZ11*, *MYB21* sowie *JAZ5* durchgeführt. Für die Generierung der Hefe-Vektoren waren *attB1*- (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC) und *attB2*-Überhänge (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT) nötig um die Klonierung mittels BP-Clonase Kit II (Invitrogen) in den pDONR221-P1P2-Vektor zu ermöglichen. In der LR-Reaktion mittels LR-Clonase Kit II (Invitrogen) wurde durch die Rekombination in pDEST22 bzw. pDEST32 (Invitrogen) *MYB21* an die Aktivierungsdomäne und die JAZ-Proteine an die DNA-Bindedomäne des *GAL4*-TF fusioniert.

Für die BiFC-Vektoren wurden *MYB21* und die JAZ-Proteine mit *attB1*- und *attB4*- (GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGG(A)) sowie *attB3*- (GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTG) und *attB2*-Überhängen amplifiziert und in die entsprechenden Donor-Vektoren rekombiniert. Die binären Vektoren wurden durch die Verwendung von 2in1-Vektoren („NC“ und „CN“; Grefen und Blatt, 2012), wodurch *MYB21* am C-Terminus und die JAZ-Proteine am N-Terminus eine YFP-Hälfte tragen, erstellt.

Die Klonierung der binären Vektoren für die Untersuchung der funktionellen Äquivalenz von *MYB21* in *A. thaliana* erfolgte ebenfalls mittels *Gateway*-Methode. Dazu wurde die genomische Sequenz von *MYB21* aus Tomate (mit gekürztem zweiten Intron und C-

terminalem *Flag*-Tag) und *A. thaliana* mit *attB1*- und *attB2*-Überhängen aus einem Überexpressionsvektor und genomischer *A. thaliana* DNA amplifiziert und in pDONR221-P1P2 rekombiniert. Der 7281 bp lange *AtMYB21*-Promoter wurde bereits als pENTRY *attL4-MYB21pro-attR1* (pMP71) von Dr. Ivan Acosta zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Vektoren wurden zur weiteren Rekombination in pDG27, der eine *OLE1:tagRFP*-Expressionskassette zur Selektion der Transformanten enthält (Shimada et al., 2010), genutzt.

Die LR-Reaktionen wurden in einem halbierten Reaktionsansatz und aufgrund der niedrigen Effizienz über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt.

5.2.9 Transformation von *Escherichia coli* und *A. tumefaciens*

Alle klonierten Vektoren wurden in chemisch kompetente *E. coli* des Stamms *DH10B* transformiert. Dazu wurden jeweils 10 µl Ligationsansatz bzw. der gesamte Reaktionsansatz im Falle der *Gateway*-Klonierungen mit den Zellen vermischt, 20 min auf Eis belassen, 90 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und danach für 2 min wieder auf Eis gebracht. Nach Zugabe von 1 ml sterilem SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C geschüttelt und danach 70 µl auf LB-Agar (Low Salt, Duchefa) mit entsprechendem Antibiotikum sowie 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) bei einer Blau-Weiß-Selektion verteilt und über Nacht bei 38 °C inkubiert. Die Transformationsansätze mit den *Gateway*-Vektoren wurden kurz zentrifugiert, 900 µl Überstand abgenommen und die restlichen 100 µl auf LB-Agar (Low Salt, Duchefa) mit entsprechendem Antibiotikum und X-Gal gebracht, um aufgrund der geringen Effizienz alle Zellen zu verwenden.

Vektoren zur transienten oder stabilen Pflanzentransformation wurden zusätzlich in *A. tumefaciens* des Stamms *GV3101* durch Elektroschock transformiert. Hierbei wurden ebenfalls alle Zellen auf LB-Agar (Low Salt, Duchefa) mit entsprechenden Antibiotika verteilt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Zum Wachstum in Flüssigmedium wurde eine Mischung vieler Kolonien verwendet.

SOC-Medium: 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 20 mM MgCl₂;
pH 7; nach Autoklavieren Zugabe von 18 ml/L 20 % steril-filtrierter Glukose

5.2.10 Plasmid-Isolation und Überprüfung

Von transformierten *E. coli* wurden Einzelkolonien gepickt und in 4 ml LB-Broth-Flüssigmedium (Low Salt, Duchefa) mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angezogen, welches zur Plasmid-Isolation diente. Diese erfolgte nach Herstellerangaben

mit dem NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit (Macherey & Nagel). Zur Überprüfung der Richtigkeit der Plasmide wurde ein Restriktionsverdau von 500 – 900 ng Plasmid mit einem entsprechenden *fast-digest* Restriktionsenzym (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben im 20 µl-Ansatz durchgeführt. Level -1- bzw. 0- und pDONR-Vektoren wurden zusätzlich sequenziert (Eurofins). Dazu wurden jeweils 50 ng/µl in 15 µl mittels pICH41308_for-Primer (Anhang Tab. 6) oder M13-Primer (rev -29; uni -21; Eurofins) sequenziert.

5.2.11 Subzelluläre Lokalisation in *N. benthamiana*

Agrobakterien mit *35S::MYB14:GFP* bzw. *35S::MYB21:GFP* (genomische Sequenzen) Fusionskonstrukten wurden in Flüssigmedium angezogen, nach der Zentrifugation von 30 min bei 4 °C mit Antibiotika-freiem LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und mit 2 ml 2x Infiltrationsmedium und 2 ml Aqua dest. versetzt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend mit 1-ml-Spritzen ohne Kanüle in die Blattunterseiten von *N. benthamiana* infiltriert. Drei Tage später wurden 10 mm große, infiltrierte Bereiche ausgestanzt und mittels Axio-Imager (Zeiss) mit einem entsprechenden Filter für GFP und einer AxioCam Kamera (Zeiss) fotografiert.

2x Infiltrationsmedium: 10 % (w/v) Saccharose
 20 mM Glukose
 8,6 g/L MS-Medium (Basal Salt Mixture; Duchefa) pH 5,6
 20 µM Acetosyringon

5.2.12 *SplitTALE*-Versuche in *N. benthamiana*

Für Interaktionsstudien mittels *splitTALE*-Methode wurde die kodierende Sequenz von *MYB21* mit oder ohne Aktivierungsdomäne (C-terminale Deletion von 25 Aminosäuren) und *JAZ9* mittels *Golden-Gate*-Methode als Fusionen mit der *TALE*-Bindedomäne mit einer N-terminalen Deletion von 93, einer C-terminalen Deletion von 47 Aminosäuren und dem flexiblen Linker LF1 (N-terminal) oder der *TALE*-Aktivierungsdomäne (C-terminal) kloniert (Schreiber et al., 2019). Auf Selektionsantibiotika enthaltenem LB-Agar (Low Salt, Duchefa) kultivierte Agrobakterien mit den entsprechenden binären Vektoren wurden durch die Resuspension in ca. 5 ml Infiltrationsmedium (10 mM MES, 10 mM MgCl₂ und 100 µM Acetosyringon) auf eine OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt. Die Zellsuspensionen mit den benötigten Konstrukten für die Binde- bzw. Aktivierungsdomäne, *35S::GFP* sowie des Reporterkonstrukts *4xSTAP1::GUS* (Schreiber et al., 2019) wurden im Verhältnis 1:1:1 gemischt (je 600 µl) und in *N. benthamiana*-Blätter infiltriert. Drei Tage später wurden je zwei Blattscheiben (10 mm) in

flüssigem Stickstoff geerntet, mittels Kugelmühle homogenisiert und die Proteine mit jeweils 300 µl Extraktionspuffer extrahiert. Das GUS-Assay wurde wie von Kay et al. (2007) beschrieben durchgeführt. Die Inkubation mit 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid Trihydrat (Duchefa) erfolgte in zwei technischen Replikaten für 85 min bei 37 °C. Die fluorometrische Messung erfolgte im Spark-Plattenleser (Tecan). Als Standards wurde 1 µM, 10 µM, 100 µM und 1000 µM 4-Methylumbilliferon mitgeführt. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der Gesamt-Proteinmenge in Bezug auf BSA-Standards mittels Bradford-Methode unter der Nutzung von Roti-Quant (Roth) nach Herstellerangaben. Demnach wurde die GUS-Aktivität in Relation zur Gesamt-Proteinmenge berechnet. Der Vollängen-*TALE* und *35S::GUS* dienten als Positivkontrolle.

Extraktionspuffer: 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7); 10 mM EDTA; 0,1 % (w/v) SDS;
0,1 % (v/v) Triton-X100; 10 mM β-Mercaptoethanol

5.2.13 Transformation von *N. benthamiana*-Protoplasten

Die Lokalisation von MYB14 mittels *35S::MYB14::GFP* enthaltenen Vektoren sowie die MYB21-JAZ-Interaktionsstudien mittels BiFC erfolgten in Protoplasten von *N. benthamiana*.

5.2.13.1 Isolierung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 50 ml *E. coli*-Übernachtskulturen mittels PureYield™ Plasmid Midiprep Kit (Promega) nach Herstellerangaben. Zur anschließenden Fällung wurde die DNA im Verhältnis 1:1 mit PEG-Lösung gemischt, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und 20 min bei 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen bei 37°C erfolgte die Lösung des Pellets in 20 µl Aqua dest.

5.2.13.2 Protoplasten-Isolation

Die Protoplasten-Isolation erfolgte mit einigen Modifikation laut Yoo et al. (2007) aus dem dritten und vierten Blatt von 4 Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen. Die Blätter wurden in kleine Stücke geschnitten und in der Enzymlösung für 30 min Vakuum-infiltriert. Danach wurde der Ansatz für 3 h im Dunkeln inkubiert, gefolgt von leichtem Schütteln für 30 min. Die Protoplasten wurden direkt anschließend durch einen Nylonfilter (100 µm) filtriert, für 1 min bei 4 °C und 200 g zentrifugiert und in 2 ml W5-Lösung (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM MES, pH 5,7) resuspendiert. Daraufhin kam es zweimalig zur Sedimentation der Protoplasten bei der Lagerung im Dunkeln auf Eis für jeweils 40 min. Die erste Resuspension erfolgte erneut mit W5-

Lösung, die zweite in 3 ml MMG-Puffer (0,4 M Mannitol; 15 mM MgCl₂; 4 mM MES; pH 5,7), um die Dichte auf 10⁵ Protoplasten per ml einzustellen.

Enzymlösung: 5 % (w/v) Cellulase „Onozuka“ R-10 und 0,4 % (w/v) Macerozym R-10 (Yakult) in
0,4 M Mannitol; 20 mM KCl; 20 mM MES (pH 5,7); 110 mM CaCl₂;
0,1% BSA

5.2.13.3 Transformation der Protoplasten und Analyse

200 µl der Protoplastensuspension wurden mit 10 µg DNA und 40 % (w/v) PEG in 0,2 M Mannitol und 100 mM CaCl₂ für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von W5-Lösung wurden die Zellen für 1 min bei 4°C und 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Protoplasten in 200 µl WI-Puffer (0,5 mM Mannitol, 20 mM KCl, 4 mM MES, pH 5,7) resuspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bildaufnahme erfolgte an einem konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM700, Zeiss) bei einer Anregung von 488 nm zur Detektion der GFP-, YFP-Fluoreszenz bei 493-531 nm im Unterschied zur Autofluoreszenz des Chlorophylls bei 644-800 nm und der RFP-Fluoreszenz bei 488-555 nm. Für die BiFC-Experimente wurde jede MYB21-JAZ-Kombination in mindestens zwei unabhängigen Transformationsansätzen analysiert, wobei jeweils 100 transformierte Protoplasten (RFP-Fluoreszenz) ausgezählt wurden.

5.2.14 Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien

5.2.14.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Hefezellen des Stamms PJ69-4a wurde in 50 ml YPAD-Medium für ca. 13 h bei 28 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bis 1,5 angezogen. Die Zellen wurden drei Mal bei 3220 g für 5 min bei Raumtemperatur pelletiert und jeweils mit 10 ml und dann 1 ml Aqua dest resuspendiert. Die dritte Resuspension erfolgte in 1 ml sterilem TE/Lithiumacetat-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH7,5; 0,1 M Lithiumacetat, pH7,5). Die Zellsuspension wurde erneut pelletiert, in 250 µl TE/ Lithiumacetat-Puffer resuspendiert und für 1 h bei Raumtemperatur leicht geschwenkt.

YPDA: 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Bakto-Pepton, 80 mg/l Adenin-Hemisulfat nach Autoklavieren Zugabe von 2 % (w/v) steriler Glukose

5.2.14.2 Transformation der kompetenten Hefe nach Gietz und Schiestl (2007)

Am selben Tag wurden jeweils 20 µl Hefezellen mit 2 µl Beutepiasmid (200 – 600 ng/µl; GAL4-AD:MYB21 in pDEST22), 1 µl des jeweiligen Köderplasmids (200 – 600 ng/µl) sowie PEG 3350; 0,1 M Lithiumacetat und einzelsträngiger Träger-DNA für 1 h bei 42 °C

inkubiert. Die Suspension wurde für 1 min bei 4000 g zentrifugiert und in 70 µl sterilem Aqua dest. resuspendiert, wovon je 5 µl unverdünnt sowie aus einer 1:10- und 1:100-Verdünnung auf SD-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD -Trp/-Leu; Sigma-Aldrich) pipettiert und sechs Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

5.2.14.3 Interaktionstest

Einzelkolonien wurden über Nacht bei 30 °C in 4 ml SD-TL angezogen, die OD₆₀₀ bestimmt, das benötigte Volumen für eine OD₆₀₀ von 1 zentrifugiert und in 100 µl sterilem Aqua dest. resuspendiert. Jeweils 5 µl der unverdünnten, 1:10 und 1:100 verdünnten Zellsuspensionen wurden erneut auf SD -Trp/-Leu als Kontrolle sowie auf SD -Trp/-Leu/-His (plus 2 mM 3-Amino-1,2,4-triazol) getropft und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Hefewachstum auf SD -Trp/-Leu/-His zeigte die Interaktion von MYB21 und dem jeweiligen JAZ-Protein.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Western-Blot-Analyse

MYB21:GFP sowie MYB14:Flag und MYB21:Flag (*N*- und *C*-terminal) Fusionsproteine wurden nach der Expression in *N. benthamiana*-Blättern mittels Western-Blot nachgewiesen. Dazu wurde Gesamtprotein aus 50 mg homogenisierten Blattproben durch Zugabe von 200 µl Extraktionspuffer, Inkubation bei 95 °C für 5 min und anschließender Zentrifugation von 10 min isoliert. Der Überstand wurde anschließend zur Proteinbestimmung nach ESEN genutzt (Esen, 1978). Jeweils 10 µg Gesamtprotein wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gel (Laemmli, 1970) aufgetrennt und entsprechend von Standardprotokollen für 20 min bei 15 Volt auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Immunomarkierung erfolgte mit einem anti-GFP- (SC9996, Santa Cruz Biotechnologie) bzw. anti-Flag-Primärantikörper (Sigma-Aldrich) in einer 1:1000 bzw. 1:10000 Verdünnung und einem anti-Maus IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase (1:5000; EMD Millipore Corporation) als Sekundärantikörper. Die Farbreaktion erfolgte mit 0,4 M Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (Roth) und 0,5 M 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (Roth) im Detektionspuffer.

Extraktionspuffer: 25 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 % SDS; 1 % Mercaptoethanol

Detektionspuffer: 0,1 M Tris-HCl; pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂

5.3.2 GUS-Färbung von Tomatenblüten

Die GUS-Färbungen wurden entsprechend Blume und Grierson (1997) durchgeführt. Dazu wurde jeweils die gesamte Blüte längs geschnitten, sofort in die Fixierlösung

überführt und für 5 min Vakuum-infiltriert. Nach 30-minütigem Schwenken wurden die Proben drei Mal mit 50 mM NaH₂PO₄ gewaschen und nach Zugabe der Färbelösung für 5 min Vakuum-infiltriert. Die Färbung erfolgte über mehrere Stunden bei 37 °C, gefolgt von einer Fixierung über Nacht durch FPA (45 % Ethanol, 5 % Formalin, 5 % Essigsäure) bei 4 °C. Abschließend wurden die Proben mehrmals mit 96 % Ethanol entfärbt.

Färbelösung: 100 mM Tris-HCl; pH 7; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,2% Triton X-100;
0,1 mM K₃[Fe(CN)₆]; 0,1 mM K₄[Fe(CN)₆]; 10 mM β-Mercaptoethanol

5.3.3 Pollenvitalitätstest

Zur Bestimmung der Pollenvitalität wurden die Kelch- und Kronblätter sowie die Antherenspitze geöffneter Blüten entfernt und die Antheren in MS-Medium mit 10 % Saccharose ausgeklopft. Der Vitalitätstest erfolgte mit Fluoresceindiacetat (FDA) nach Heslop-Harrison und Heslop-Harrison (1970). Dazu wurden drei Tropfen Pollenlösung mit drei Tropfen 0,01 % FDA in MS-Medium mit 10 % Saccharose direkt auf dem Objektträger vermischt und nach 5 min im Dunkeln am Axioplan (Zeiss) bei einer Anregung von 490 nm die grüne Fluoreszenz bei 520 nm detektiert. Durch die Akkumulation von Fluorescein fluoreszieren lebende Pollen grün, während tote Zellen dunkel bleiben.

5.3.4 Semidünnschnitte von Samenanlagen

Manuelle Querschnitte aus der Mitte der Fruchtknoten wurden sofort in 3 % (v/v) Glutardialdehyd in Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,2) überführt und mittels Vakuuminfiltration fixiert. Die Einbettungen und Schnitte wurden freundlicherweise von der AG von Dr. Gerd Hause angefertigt. Dies umfasste die Entwässerung mittels einer Ethanol-Serie und die Einbettung in Epoxidharz (Spurr, 1969). Semidünnschnitte der Dicke von 1 µm wurden mit Toluidin-blau gefärbt. Die Bildaufnahme erfolgte am Hellfeldmikroskop AxioImager (Zeiss).

5.3.5 Quantifizierung von OPDA, JA, JA-Ile und GAs

Die Quantifizierung von OPDA, JA und JA-Ile erfolgte mit ca. 50 mg homogenisierten Fruchtblatt- und Staubblattproben des Blütenstadiums 3 des Wildtyps sowie der Mutanten *jai1-1*, *myb21-1*, *myb21-2* und *myb21-3* entsprechend Balcke et al. (2012). Die Probenaufbereitung wurde von Hagen Stellmach durchgeführt. Die Extraktion erfolgte mit 500 µl 100 %-LC-MS-Methanol. Jeder Probe wurden je 50 ng [²H₅]OPDA, [²H₆]JA, und [²H₂] JA-Ile als interner Standard zugegeben. Nach Zentrifugation wurde der

Überstand mit LC-MS-Wasser auf ein Methanol:Wasser-Verhältnis von 10:90 gebracht. Die Festphasenextraktion erfolgte auf einer 96 HR-XC Well-Platte (Macherey & Nagel) mit der abschließenden Elution mittels 900 µl LC-MS-Acetonitril. Die Phytohormonmessung erfolgte mit jeweils 10 µl Eluat mittels UPLC-MS/MS (Balcke et al., 2012).

Die GA-Gehalte von Fruchtblättern des Stadiums 3 des Wildtyps sowie der Mutanten *jai1-1* und *myb21-2* wurden aus ca. 30 mg Frischmaterial von Dr. Danuše Tarkowská, durchgeführt. Als interne Standards dienen [²H₂]GA₁, [²H₂]GA₃, [²H₂]GA₄, [²H₂]GA₅, [²H₂]GA₆, [²H₂]GA₇, [²H₂]GA₈, [²H₂]GA₉, [²H₂]GA₁₂, [²H₂]GA_{12ald}, [²H₂]GA₁₅, [²H₂]GA₁₉, [²H₂]GA₂₀, [²H₂]GA₂₄, [²H₂]GA₂₉, [²H₂]GA₃₄, [²H₂]GA₄₄, [²H₂]GA₅₁ und [²H₂]GA₅₃ (OChemIm, Olomouc, Tschechien). Die Messungen wurden mittels UPLC (Acquity UPLC™ System; Waters), gekoppelt mit einem Triple-Quadrupole-Massenspektrometer (Xevo® TQ MS, Waters) durchgeführt.

5.4 Pflanzenphysiologische Arbeiten

5.4.1 Bestimmung des Wassergehaltes von Staubblättern

Das Frischgewicht (FG) eines einzelnen Staubblattes des Blütenstadiums 6 wurde bestimmt, wobei jede Blüte als biologisches Replikat betrachtet wurde. Nach der Lagerung für eine Woche bei 50 °C im Trockenschrank wurde das Trockengewicht (TG) bestimmt und der Wassergehalt in % entsprechend $\frac{FG-TG}{FG} \times 100$ errechnet.

5.4.2 Pollenschlauchwachstum *in vitro*

Nach dem Abschneiden der Antherenspitze wurden die Pollen in PCR-Tubes mit Keimungsmedium (Read et al., 1993) ausgeschüttelt. Je 80 µl Pollenlösung wurden auf Objektträger aufgebracht, die auf Zahnstochern in Petrischalen (mit Deckel) überführt wurden. Die Petrischalen wiederum wurden für 5 h in einer Styroporbox mit nassen Filterpapieren gelagert. Anschließend wurden die Objektträger mit Deckgläschen versehen, was das Wachstum der Pollenschläuche beendet und am Axio-Imager (Zeiss) mit einer AxioCam-Kamera (Zeiss) analysiert.

Keimungsmedium: 5 % (w/v) Sucrose; 12,5 % (w/v) PEG-4000;
15 mM MES-KOH pH 5,9; 1 mM CaCl₂; 1 mM KCl; 0,8 mM MgSO₄;
1,6 mM H₃BO₃; 30µM CuSO₄

5.4.3 Stabile Tomatentransformation

Die Transformation von *S. lycopersicum* cv. MicroTom erfolgte durch somatische Embryogenese aus zweifach geschnittenen Keimblattstückchen von 8 Tage alten Keimlingen (auf Phytoagar, Duchefa) laut Schubert et al. (2019). Die Kotyledonenstücke wurden einen Tag mit der Blattoberseite nach unten auf KCMS-Medium präkonditioniert (Tab. 2). Übernachtskulturen von Agrobakterien mit entsprechenden Level2-Vektoren wurden für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in flüssigem KCMS-Medium (ohne Agar) resuspendiert. Eine OD₆₀₀ von 0,08 wurde in einem finalen Volumen von 50 ml eingestellt (Fernandez et al., 2009). Die Keimblattstückchen wurden in die Agrobakterien-Lösung überführt, 30 min im Dunkeln geschwenkt und erneut mit der Blattoberseite nach unten auf KCMS-Medium transferiert. Nach zwei Tagen im Dunkeln wurden sie mit der Blattoberfläche nach oben auf 2Z-Medium überführt und für zwei Wochen unter Langtagbedingungen bei 24 °C kultiviert. Kalli wurden auf 1Z-Medium und zwei Wochen später nach Entfernen von braunem Gewebe auf 0,5Z-Medium transferiert (Tab. 2). Weißes Gewebe zeigte eine fehlende Transformation und wurde entfernt. Die sich entwickelnden Sprosse wurden unter Beibehaltung eines kleinen Kallusgewebes auf GA-Medium umgesetzt. Nach weiteren zwei Wochen erfolgte die Überführung auf Bewurzelungsmedium, wonach die Primärtransformanten bei Wurzelbildung in Erde überführt und die ersten Tage unter hoher Luftfeuchte kultiviert wurden.

Tab. 2: Zusammensetzung der Kultivierungsmedien für die stabile Tomatentransformation

	KCMS-Medium	2Z-; 1Z-; 0,5Z- // GA-Medium	Bewurzelungs- medium
MS-Medium, inklusive Vitamine (Duchefa)	4,4 g/l	4,4 g/l	4,3 g/l
Sucrose	20 g/l	30 g/l	30 g/l
KH ₂ PO ₄	200 mg/l		
Myo-Inosit (Merck)		100 mg/l	100 mg/l
Agar (Sigma-Aldrich)	8 g/l	8 g/l	7 g/l
Zugabe nach Autoklavieren:			
Thiamin	0,9 mg/l		
Kinetin	100 µg/l		
Nitsch-Vitamine (1000x; Duchefa)		1 ml/l	1 ml/l
Timentin		300- 400 mg/l	300- 400 mg/l
Kanamycin		100 mg/l	100 mg/l
IAA	0,5 mg/l	0,1 mg/l	
<i>trans</i> -Zeatinribosid // Gibberellinsäure		2; 1 bzw. 0,5 mg/l // 0,1 mg/l	

5.4.4 Generierung und Identifizierung transgener *A. thaliana*-Pflanzen

Atmyb21-5-heterozygote Pflanzen (Reeves et al., 2012) wurden mittels *flower-dip*-Methode transformiert (Clough et al., 1998). Dazu wurden entsprechende Agrobakterien aus einer Vorkultur in 300 ml LB-Broth-Medium (Low Salt, Duchefa) mit Selektionsantibiotikum bis zu einer $OD_{600} > 2$ angezogen, für 30 min bei 3000 g zentrifugiert, in 5 % Saccharose mit 0,05 % Silwet-Lösung resuspendiert und auf eine OD_{600} von 0,8 eingestellt. Transformierte Samen wurden durch ihre rote Fluoreszenz aufgrund der Synthese des OLE1:RFP-Fusionsproteins in der Samenschale selektiert. Segregierende homozygote *myb21-5*-Pflanzen wurden mittels CAPS-Marker identifiziert. Dazu wurde das PCR-Produkt aus einer PCR mit einem vorwärts-Primer, der nur in der endogenen 5'UTR von *AtMYB21* bindet, für 2 h bei 37 °C mit *EcoRI-high fidelity* (NEB) verdaut (Primer Anhang Tab. 8). Dabei wurde nur das Wildtyp-Allel verdaut (815 und 136 bp), während das mutierte Allel intakt blieb (951 bp).

6 Literaturverzeichnis

- Acosta IF, Laparra H, Romero SP, Schmelz E, Hamberg M, Mottinger JP, Moreno MA, Dellaporta SL (2009) *tasselseed1* Is a Lipoxygenase Affecting Jasmonic Acid Signaling in Sex Determination of Maize. *Science (New York, NY)* 323 (5911):262-265. doi:10.1126/science.1164645
- Alabadi D, Aguero MS, Perez-Amador MA, Carbonell J (1996) Arginase, Arginine Decarboxylase, Ornithine Decarboxylase, and Polyamines in Tomato Ovaries (Changes in Unpollinated Ovaries and Parthenocarpic Fruits Induced by Auxin or Gibberellin). *Plant Physiol* 112 (3):1237-1244. doi:10.1104/pp.112.3.1237
- Arnold MD, Gruber C, Flokova K, Miersch O, Strnad M, Novak O, Wasternack C, Hause B (2016) The Recently Identified Isoleucine Conjugate of cis-12-Oxo-Phytodienoic Acid Is Partially Active in cis-12-Oxo-Phytodienoic Acid-Specific Gene Expression of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 11 (9):e0162829. doi:10.1371/journal.pone.0162829
- Audran-Delalande C, Bassa C, Mila I, Regad F, Zouine M, Bouzayen M (2012) Genome-wide identification, functional analysis and expression profiling of the Aux/IAA gene family in tomato. *Plant Cell Physiol* 53 (4):659-672. doi:10.1093/pcp/pcs022
- Balcke GU, Handrick V, Bergau N, Fichtner M, Henning A, Stellmach H, Tissier A, Hause B, Frolov A (2012) An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant methods* 8 (1):47. doi:10.1186/1746-4811-8-47
- Barg R, Sobolev I, Eilon T, Gur A, Chmelnitsky I, Shabtai S, Grotewold E, Salts Y (2005) The tomato early fruit specific gene *Lefsm1* defines a novel class of plant-specific SANT/MYB domain proteins. *Planta* 221 (2):197-211. doi:10.1007/s00425-004-1433-0
- Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* 20 (6):1195-1197
- Bensen RJ, Zeevaart JAD (1990) Comparison of Ent-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib-1*, *gib-2*, and *gib-3* tomato plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 9 (1):237. doi:10.1007/bf02041969

- Berardini TZ, 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. doi:10.1002/dvg.22877
- Blume B, Grierson D (1997) Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J* 12 (4):731-746
- Bohner J, Hedden P, Bora-Haber E, Bangerth F (1988) Identification and quantitation of gibberellins in fruits of *Lycopersicon esculentum*, and their relationship to fruit size in *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Physiologia Plantarum* 73 (3):348-353. doi:10.1111/j.1399-3054.1988.tb00609.x
- Brioudes F, Joly C, Szecsi J, Varaud E, Leroux J, Bellvert F, Bertrand C, Bendahmane M (2009) Jasmonate controls late development stages of petal growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 60 (6):1070-1080. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04023.x
- Cai Q, Yuan Z, Chen M, Yin C, Luo Z, Zhao X, Liang W, Hu J, Zhang D (2014) Jasmonic acid regulates spikelet development in rice. *Nat Commun* 5:3476. doi:10.1038/ncomms4476
- Cao D, Cheng H, Wu W, Soo HM, Peng J (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 142 (2):509-525. doi:10.1104/pp.106.082289
- Cecchetti V, Altamura MM, Brunetti P, Petrocelli V, Falasca G, Ljung K, Costantino P, Cardarelli M (2013) Auxin controls *Arabidopsis* anther dehiscence by regulating endothecium lignification and jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* 74 (3):411-422. doi:10.1111/tpj.12130
- Cermak T, Baltes NJ, Cegan R, Zhang Y, Voytas DF (2015) High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* 16:232. doi:10.1186/s13059-015-0796-9
- Chapman EJ, Estelle M (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* 43:265-285. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134148
- Chen S, Wang X, Zhang L, Lin S, Liu D, Wang Q, Cai S, El-Tanbouly R, Gan L, Wu H, Li Y (2016a) Identification and characterization of tomato gibberellin 2-oxidases

- (GA2oxs) and effects of fruit-specific *S/GA2ox1* overexpression on fruit and seed growth and development. *Hortic Res* 3:16059. doi:10.1038/hortres.2016.59
- Chen X, Huang H, Qi T, Liu B, Song S (2016b) New perspective of the bHLH-MYB complex in jasmonate-regulated plant fertility in arabidopsis. *Plant Signal Behav* 11 (2):e1135280. doi:10.1080/15592324.2015.1135280
- Cheng H, Song S, Xiao L, Soo HM, Cheng Z, Xie D, Peng J (2009) Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of *MYB21*, *MYB24*, and *MYB57* to promote stamen filament growth in Arabidopsis. *PLoS Genet* 5 (3):e1000440. doi:10.1371/journal.pgen.1000440
- Chini A, Ben-Romdhane W, Hassairi A, Aboul-Soud MAM (2017) Identification of TIFY/JAZ family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses. *PLoS One* 12 (6):e0177381. doi:10.1371/journal.pone.0177381
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448 (7154):666-671. doi:10.1038/nature06006
- Chini A, Gimenez-Ibanez S, Goossens A, Solano R (2016) Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Curr Opin Plant Biol* 33:147-156. doi:10.1016/j.pbi.2016.07.005
- Chini A, Monte I, Zamarreno AM, Hamberg M, Lassueur S, Reymond P, Weiss S, Stintzi A, Schaller A, Porzel A, Garcia-Mina JM, Solano R (2018) An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nat Chem Biol* 14 (2):171-178. doi:10.1038/nchembio.2540
- Chung HS, Cooke TF, Depew CL, Patel LC, Ogawa N, Kobayashi Y, Howe GA (2010) Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *Plant J* 63 (4):613-622. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04265.x
- Chung HS, Howe GA (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *Plant Cell* 21 (1):131-145. doi:10.1105/tpc.108.064097
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16 (6):735-743

- Crane JC (1964) Growth Substances in Fruit Setting and Development. Annual Review of Plant Physiology 15 (1):303-326. doi:10.1146/annurev.pp.15.060164.001511
- de Jong M, Mariani C, Vriezen WH (2009) The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. J Exp Bot 60 (5):1523-1532. doi:10.1093/jxb/erp094
- de Jong M, Wolters-Arts M, Garcia-Martinez JL, Mariani C, Vriezen WH (2011) The *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (SIARF7) mediates cross-talk between auxin and gibberellin signalling during tomato fruit set and development. J Exp Bot 62 (2):617-626. doi:10.1093/jxb/erq293
- de Jong M, Wolters-Arts M, Schimmel BC, Stultiens CL, de Groot PF, Powers SJ, Tikunov YM, Bovy AG, Mariani C, Vriezen WH, Rieu I (2015) *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 9 regulates cell division activity during early tomato fruit development. J Exp Bot 66 (11):3405-3416. doi:10.1093/jxb/erv152
- de Mesa MC, Santiago-Domenech N, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2004) The *CaMV* 35S promoter is highly active on floral organs and pollen of transgenic strawberry plants. Plant Cell Rep 23 (1-2):32-38. doi:10.1007/s00299-004-0776-0
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435 (7041):441-445. doi:10.1038/nature03543
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. Dev Cell 9 (1):109-119. doi:10.1016/j.devcel.2005.05.014
- Dobritsch S, Weyhe M, Schubert R, Dindas J, Hause G, Kopka J, Hause B (2015) Dissection of jasmonate functions in tomato stamen development by transcriptome and metabolome analyses. BMC Biol 13:28. doi:10.1186/s12915-015-0135-3
- Dreher KA, Brown J, Saw RE, Callis J (2006) The Arabidopsis Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. Plant Cell 18 (3):699-714. doi:10.1105/tpc.105.039172
- Drews GN, Koltunow AM (2011) The female gametophyte. Arabidopsis Book 9:e0155. doi:10.1199/tab.0155

- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 15 (10):573-581. doi:10.1016/j.tplants.2010.06.005
- Dutt M, Dhekney SA, Soriano L, Kandel R, Grosser JW (2014) Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Hortic Res* 1:14047. doi:10.1038/hortres.2014.47
- Endress PK (2011) Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Ann Bot* 107 (9):1465-1489. doi:10.1093/aob/mcr120
- Esau K (1969) Pflanzenanatomie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Esen A (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein. *Analytical biochemistry* 89 (1):264-273
- Exposito-Rodriguez M, Borges AA, Borges-Perez A, Perez JA (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* 8:131. doi:10.1186/1471-2229-8-131
- Fernandez AI, Viron N, Alhagdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D, May S, Seymour G, Eshed Y, Lemaire-Chamley M, Rothan C, Hilson P (2009) Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol* 151 (4):1729-1740. doi:10.1104/pp.109.147546
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG (1994) Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* 6 (5):751-759. doi:10.1105/tpc.6.5.751
- Figueroa P, Browse J (2015) Male sterility in Arabidopsis induced by overexpression of a MYC5-SRDX chimeric repressor. *Plant J* 81 (6):849-860. doi:10.1111/tpj.12776
- Flors V, Leyva Mde L, Vicedo B, Finiti I, Real MD, Garcia-Agustin P, Bennett AB, Gonzalez-Bosch C (2007) Absence of the endo-beta-1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant J* 52 (6):1027-1040. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03299.x
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* 5 (5):344-350. doi:10.1038/nchembio.161

- Fos M, Nuez F, Garcia-Martinez JL (2000) The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol* 122 (2):471-480. doi:10.1104/pp.122.2.471
- Froehlich JE, Itoh A, Howe GA (2001) Tomato Allene Oxide Synthase and Fatty Acid Hydroperoxide Lyase, Two Cytochrome P450s Involved in Oxylipin Metabolism, Are Targeted to Different Membranes of Chloroplast Envelope. *Plant Physiol* 125:306-317
- Garcia-Hurtado N, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Lopez-Gresa MP, Hedden P, Gong F, Garcia-Martinez JL (2012) The characterization of transgenic tomato overexpressing *gibberellin 20-oxidase* reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. *J Exp Bot* 63 (16):5803-5813. doi:10.1093/jxb/ers229
- Gietz RD, Schiestl RH (2007) Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2 (1):38-41. doi:10.1038/nprot.2007.15
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W (1993) Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell* 5 (10):1439-1451. doi:10.1105/tpc.5.10.1439
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Ortigosa A, Garcia-Casado G, Chini A, Lewsey MG, Ecker JR, Ntoukakis V, Solano R (2017) JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytol* 213 (3):1378-1392. doi:10.1111/nph.14354
- Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JC, Vivian-Smith A, Koltunow AM (2007) Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiol* 145 (2):351-366. doi:10.1104/pp.107.104174
- Goetz S, Hellwege A, Stenzel I, Kutter C, Hauptmann V, Forner S, McCaig B, Hause G, Miersch O, Wasternack C, Hause B (2012) Role of cis-12-oxo-phytodienoic acid in tomato embryo development. *Plant Physiol* 158 (4):1715-1727. doi:10.1104/pp.111.192658
- Goossens J, Fernandez-Calvo P, Schweizer F, Goossens A (2016) Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses. *Plant Mol Biol* 91 (6):673-689. doi:10.1007/s11103-016-0480-9

- Grefen C, Blatt MR (2012) A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC). *Biotechniques* 53 (5):311-314. doi:10.2144/000113941
- Grunewald W, Vanholme B, Pauwels L, Plovie E, Inze D, Gheysen G, Goossens A (2009) Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep* 10 (8):923-928. doi:10.1038/embor.2009.103
- Guilfoyle TJ, Hagen G (2007) Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 10 (5):453-460. doi:10.1016/j.pbi.2007.08.014
- Hao Y, Hu G, Breitel D, Liu M, Mila I, Frasse P, Fu Y, Aharoni A, Bouzayen M, Zouine M (2015) Auxin Response Factor SIARF2 Is an Essential Component of the Regulatory Mechanism Controlling Fruit Ripening in Tomato. *PLoS Genet* 11 (12):e1005649. doi:10.1371/journal.pgen.1005649
- Haughn G, Chaudhury A (2005) Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 10 (10):472-477. doi:10.1016/j.tplants.2005.08.005
- Hause B, Stenzel I, Miersch O, Maucher H, Kramell R, Ziegler J, Wasternack C (2000) Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant J* 24 (1):113-126
- Hedden P, Thomas SG (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* 444 (1):11-25. doi:10.1042/BJ20120245
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain technology* 45 (3):115-120
- Hou X, Lee LY, Xia K, Yan Y, Yu H (2010) DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* 19 (6):884-894. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.024
- Hraška M, Rakoušký S, Čurn V (2007) Tracking of the *CaMV-35S* promoter performance in GFP transgenic tobacco, with a special emphasis on flowers and reproductive organs, confirmed its predominant activity in vascular tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94 (3):239-251. doi:10.1007/s11240-007-9312-6

- Hu J, Israeli A, Ori N, Sun TP (2018) The Interaction between DELLA and ARF/IAA Mediates Crosstalk between Gibberellin and Auxin Signaling to Control Fruit Initiation in Tomato. *Plant Cell* 30 (8):1710-1728. doi:10.1105/tpc.18.00363
- Huang H, Gao H, Liu B, Qi T, Tong J, Xiao L, Xie D, Song S (2017) Arabidopsis MYB24 Regulates Jasmonate-Mediated Stamen Development. *Front Plant Sci* 8:1525. doi:10.3389/fpls.2017.01525
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K (2001) The *DEFECTIVE IN ANTHETER DEHISCENCE* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* 13 (10):2191-2209. doi:10.1105/tpc.010192
- Jensen AB, Raventos D, Mundy J (2002) Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in Arabidopsis. *Plant J* 29 (5):595-606
- Jewell JB, Browse J (2016) Epidermal jasmonate perception is sufficient for all aspects of jasmonate-mediated male fertility in Arabidopsis. *Plant J* 85 (5):634-647. doi:10.1111/tpj.13131
- Kagale S, Links MG, Rozwadowski K (2010) Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol* 152 (3):1109-1134. doi:10.1104/pp.109.151704
- Kagale S, Rozwadowski K (2014) EAR motif-mediated transcriptional repression in plants. *Epigenetics* 6 (2):141-146. doi:10.4161/epi.6.2.13627
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science (New York, NY)* 318 (5850):648-651. doi:10.1126/science.1144956
- Klepikova AV, Kasianov AS, Gerasimov ES, Logacheva MD, Penin AA (2016) A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J* 88 (6):1058-1070. doi:10.1111/tpj.13312
- Koo AJ, Howe GA (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70 (13-14):1571-1580. doi:10.1016/j.phytochem.2009.07.018
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685

- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1994) The *never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. *The Plant Cell* 6 (4):521-530. doi:10.1105/tpc.6.4.521
- Larsson E, Vivian-Smith A, Offringa R, Sundberg E (2017) Auxin Homeostasis in Arabidopsis Ovules Is Anther-Dependent at Maturation and Changes Dynamically upon Fertilization. *Front Plant Sci* 8:1735. doi:10.3389/fpls.2017.01735
- Lashbrook CC, Gonzalez-Bosch C, Bennett AB (1994) Two divergent endo-beta-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell* 6 (10):1485-1493. doi:10.1105/tpc.6.10.1485
- Laudert D, Weiler EW (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J* 15 (5):675-684
- Li C, Schillmiller AL, Liu G, Lee GI, Jayanty S, Sageman C, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Yagi K, Kobayashi Y, Howe GA (2005) Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell* 17 (3):971-986. doi:10.1105/tpc.104.029108
- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA (2004) The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16 (1):126-143. doi:10.1105/tpc.017954
- Li R, Wang M, Wang Y, Schuman MC, Weinhold A, Schafer M, Jimenez-Aleman GH, Barthel A, Baldwin IT (2017) Flower-specific jasmonate signaling regulates constitutive floral defenses in wild tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (34):E7205-E7214. doi:10.1073/pnas.1703463114
- Li Z, Peng R, Tian Y, Han H, Xu J, Yao Q (2016) Genome-Wide Identification and Analysis of the MYB Transcription Factor Superfamily in *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Physiol* 57 (8):1657-1677. doi:10.1093/pcp/pcw091
- Liu L, Zou Z, Qian K, Xia C, He Y, Zeng H, Zhou X, Riemann M, Yin C (2017) Jasmonic acid deficiency leads to scattered floret opening time in cytoplasmic male sterile rice Zhenshan 97A. *J Exp Bot* 68 (16):4613-4625. doi:10.1093/jxb/erx251
- Liu N, Wu S, Van Houten J, Wang Y, Ding B, Fei Z, Clarke TH, Reed JW, van der Knaap E (2014) Down-regulation of *AUXIN RESPONSE FACTORS 6* and *8* by

- microRNA 167 leads to floral development defects and female sterility in tomato. *J Exp Bot* 65 (9):2507-2520. doi:10.1093/jxb/eru141
- Liu S, Zhang Y, Feng Q, Qin L, Pan C, Lamin-Samu AT, Lu G (2018) Tomato AUXIN RESPONSE FACTOR 5 regulates fruit set and development via the mediation of auxin and gibberellin signaling. *Sci Rep* 8 (1):2971. doi:10.1038/s41598-018-21315-y
- Lu J, Magnani E (2018) Seed tissue and nutrient partitioning, a case for the nucellus. *Plant Reprod* 31 (3):309-317. doi:10.1007/s00497-018-0338-1
- Machemer K, Shaiman O, Salts Y, Shabtai S, Sobolev I, Belausov E, Grotewold E, Barg R (2011) Interplay of MYB factors in differential cell expansion, and consequences for tomato fruit development. *Plant J* 68 (2):337-350. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04690.x
- Major IT, Yoshida Y, Campos ML, Kapali G, Xin XF, Sugimoto K, de Oliveira Ferreira D, He SY, Howe GA (2017) Regulation of growth-defense balance by the JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)-MYC transcriptional module. *New Phytol* 215 (4):1533-1547. doi:10.1111/nph.14638
- Mandaokar A, Browse J (2009) MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in Arabidopsis. *Plant Physiol* 149 (2):851-862. doi:10.1104/pp.108.132597
- Mandaokar A, Thines B, Shin B, Lange BM, Choi G, Koo YJ, Yoo YJ, Choi YD, Choi G, Browse J (2006) Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. *Plant J* 46 (6):984-1008. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02756.x
- Marti E, Gisbert C, Bishop GJ, Dixon MS, Garcia-Martinez JL (2006) Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J Exp Bot* 57 (9):2037-2047. doi:10.1093/jxb/erj154
- McConn M, Browse J (1996) The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *Plant Cell* 8 (3):403-416. doi:10.1105/tpc.8.3.403
- Melotto M, Mecey C, Niu Y, Chung HS, Katsir L, Yao J, Zeng W, Thines B, Staswick P, Browse J, Howe GA, He SY (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and

- jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J* 55 (6):979-988. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03566.x
- Merico D, Isserlin R, Stueker O, Emili A, Bader GD (2010) Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One* 5 (11):e13984. doi:10.1371/journal.pone.0013984
- Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol* 177 (1):114-127. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02252.x
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* 47 (6):511-517. doi:10.1016/j.plaphy.2008.12.011
- Nagpal P, Ellis CM, Weber H, Ploense SE, Barkawi LS, Guilfoyle TJ, Hagen G, Alonso JM, Cohen JD, Farmer EE, Ecker JR, Reed JW (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development (Cambridge, England)* 132 (18):4107-4118. doi:10.1242/dev.01955
- Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* 31 (7):1120-1123. doi:10.1093/bioinformatics/btu743
- Niwa T, Suzuki T, Takebayashi Y, Ishiguro R, Higashiyama T, Sakakibara H, Ishiguro S (2018) Jasmonic acid facilitates flower opening and floral organ development through the upregulated expression of *SIMYB21* transcription factor in tomato. *Biosci Biotechnol Biochem* 82 (2):292-303. doi:10.1080/09168451.2017.1422107
- Ogata K, Kanei-Ishii C, Sasaki M, Hatanaka H, Nagadoi A, Enari M, Nakamura H, Nishimura Y, Ishii S, Sarai A (1996) The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nature structural biology* 3 (2):178-187
- Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Bres C, Rothan C, Mizoguchi T, Ezura H (2011) Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. *Plant Cell Physiol* 52 (11):1994-2005. doi:10.1093/pcp/pcr134
- Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Mariotti L, Ceccarelli N, Soressi GP, Mazzucato A (2007) Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele

- are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta* 226 (4):877-888. doi:10.1007/s00425-007-0533-z
- Pacini E, Guarnieri M, Nepi M (2006) Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma* 228 (1-3):73-77. doi:10.1007/s00709-006-0169-z
- Pacini E, Jacquard C, Clement C (2011) Pollen vacuoles and their significance. *Planta* 234 (2):217-227. doi:10.1007/s00425-011-1462-4
- Pandolfini T, Molesini B, Spena A (2007) Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends Plant Sci* 12 (8):327-329. doi:10.1016/j.tplants.2007.06.011
- Park JH, Halitschke R, Kim HB, Baldwin IT, Feldmann KA, Feyereisen R (2002) A knock-out mutation in *allene oxide synthase* results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* 31 (1):1-12
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tillemans S, Grunewald W, Perez AC, Chico JM, Bossche RV, Sewell J, Gil E, Garcia-Casado G, Witters E, Inze D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* 464 (7289):788-791. doi:10.1038/nature08854
- Pauwels L, Goossens A (2011) The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* 23 (9):3089-3100. doi:10.1105/tpc.111.089300
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H (1987) The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO journal* 6 (12):3553-3558
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (9):e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, Zamir D, Lifschitz E (1998) The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development (Cambridge, England)* 125 (11):1979-1989

- Qi T, Huang H, Song S, Xie D (2015) Regulation of Jasmonate-Mediated Stamen Development and Seed Production by a bHLH-MYB Complex in Arabidopsis. *Plant Cell* 27 (6):1620-1633. doi:10.1105/tpc.15.00116
- Qi T, Huang H, Wu D, Yan J, Qi Y, Song S, Xie D (2014) Arabidopsis DELLA and JAZ proteins bind the WD-repeat/bHLH/MYB complex to modulate gibberellin and jasmonate signaling synergy. *Plant Cell* 26 (3):1118-1133. doi:10.1105/tpc.113.121731
- Read SM, Clarke AE, Bacic A (1993) Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W 38 pollen tubes by poly(ethylene glycol) and Cu(II) salts. *Protoplasma* 177 (1):1-14. doi:10.1007/bf01403393
- Rebers M, Kaneta T, Kawaide H, Yamaguchi S, Yang YY, Imai R, Sekimoto H, Kamiya Y (1999) Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *Plant J* 17 (3):241-250
- Reeves PH, Ellis CM, Ploense SE, Wu MF, Yadav V, Tholl D, Chetelat A, Haupt I, Kennerley BJ, Hodgens C, Farmer EE, Nagpal P, Reed JW (2012) A regulatory network for coordinated flower maturation. *PLoS Genet* 8 (2):e1002506. doi:10.1371/journal.pgen.1002506
- Ribot C, Zimmerli C, Farmer EE, Reymond P, Poirier Y (2008) Induction of the Arabidopsis PHO1;H10 gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-dependent pathway. *Plant Physiol* 147 (2):696-706. doi:10.1104/pp.108.119321
- Rieu I, Ruiz-Rivero O, Fernandez-Garcia N, Griffiths J, Powers SJ, Gong F, Linhartova T, Eriksson S, Nilsson O, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (2008) The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant J* 53 (3):488-504. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03356.x
- Rogers HJ (2005) Cell death and organ development in plants. *Current topics in developmental biology* 71:225-261. doi:10.1016/s0070-2153(05)71007-3
- Saito H, Oikawa T, Hamamoto S, Ishimaru Y, Kanamori-Sato M, Sasaki-Sekimoto Y, Utsumi T, Chen J, Kanno Y, Masuda S, Kamiya Y, Seo M, Uozumi N, Ueda M, Ohta H (2015) The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in Arabidopsis. *Nat Commun* 6:6095. doi:10.1038/ncomms7095

- Sawhney VK (1984) Gibberellins and fruit formation in tomato: A review. *Scientia Horticulturae* 22 (1):1-8. doi:10.1016/0304-4238(84)90077-3
- Schneitz K, Hülskamp M, Pruitt RE (1995) Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J* 7 (5):731-749. doi:10.1046/j.1365-313X.1995.07050731.x
- Schreiber T, Prange A, Hoppe T, Tissier A (2019) Split-TALE: A TALE-Based Two-Component System for Synthetic Biology Applications in Planta. *Plant Physiol* 179 (3):1001-1012. doi:10.1104/pp.18.01218
- Schubert R, Dobritsch S, Gruber C, Hause G, Athmer B, Schreiber T, Marillonnet S, Okabe Y, Ezura H, Acosta IF, Tarkowska D, Hause B (2019) Tomato MYB21 Acts in Ovules to Mediate Jasmonate-regulated Fertility. *Plant Cell*. doi:10.1105/tpc.18.00978
- Serrani JC, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Gallego-Giraldo L, Peres LE, Garcia-Martinez JL (2010) Inhibition of auxin transport from the ovary or from the apical shoot induces parthenocarpic fruit-set in tomato mediated by gibberellins. *Plant Physiol* 153 (2):851-862. doi:10.1104/pp.110.155424
- Serrani JC, Fos M, Atarés A, García-Martínez JL (2007) Effect of Gibberellin and Auxin on Parthenocarpic Fruit Growth Induction in the cv Micro-Tom of Tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* 26 (3):211-221. doi:10.1007/s00344-007-9014-7
- Serrani JC, Ruiz-Rivero O, Fos M, Garcia-Martinez JL (2008) Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *Plant J* 56 (6):922-934. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03654.x
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468 (7322):400-405. doi:10.1038/nature09430
- Shimada TL, Shimada T, Hara-Nishimura I (2010) A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 61 (3):519-528. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04060.x
- Shin B, Choi G, Yi H, Yang S, Cho I, Kim J, Lee S, Paek N-C, Kim J-H, Song P-S, Choi G (2002) AtMYB21, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *Plant J* 30 (1):23-32. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01264.x

- Skinner DJ, Sundaresan V (2018) Recent advances in understanding female gametophyte development. *F1000Res* 7. doi:10.12688/f1000research.14508.1
- Song S, Qi T, Huang H, Ren Q, Wu D, Chang C, Peng W, Liu Y, Peng J, Xie D (2011) The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23 (3):1000-1013. doi:10.1105/tpc.111.083089
- Sorkina A, Bardosh G, Liu YZ, Fridman I, Schlizerman L, Zur N, Or E, Goldschmidt EE, Blumwald E, Sadka A (2011) Isolation of a citrus promoter specific for reproductive organs and its functional analysis in isolated juice sacs and tomato. *Plant Cell Rep* 30 (9):1627-1640. doi:10.1007/s00299-011-1073-3
- Sprunck S, Gross-Hardt R (2011) Nuclear behavior, cell polarity, and cell specification in the female gametophyte. *Sex Plant Reprod* 24 (2):123-136. doi:10.1007/s00497-011-0161-4
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of ultrastructure research* 26 (1):31-43
- Stintzi A, Browse J (2000) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (19):10625. doi:10.1073/pnas.190264497
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (43):15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
- Sun JQ, Jiang HL, Li CY (2011) Systemin/Jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato. *Mol Plant* 4 (4):607-615. doi:10.1093/mp/ssr008
- Sun X, Shantharaj D, Kang X, Ni M (2010) Transcriptional and hormonal signaling control of *Arabidopsis* seed development. *Curr Opin Plant Biol* 13 (5):611-620. doi:10.1016/j.pbi.2010.08.009
- Suresh BV, Roy R, Sahu K, Misra G, Chattopadhyay D (2014) Tomato genomic resources database: an integrated repository of useful tomato genomic information for basic and applied research. *PLoS One* 9 (1):e86387. doi:10.1371/journal.pone.0086387

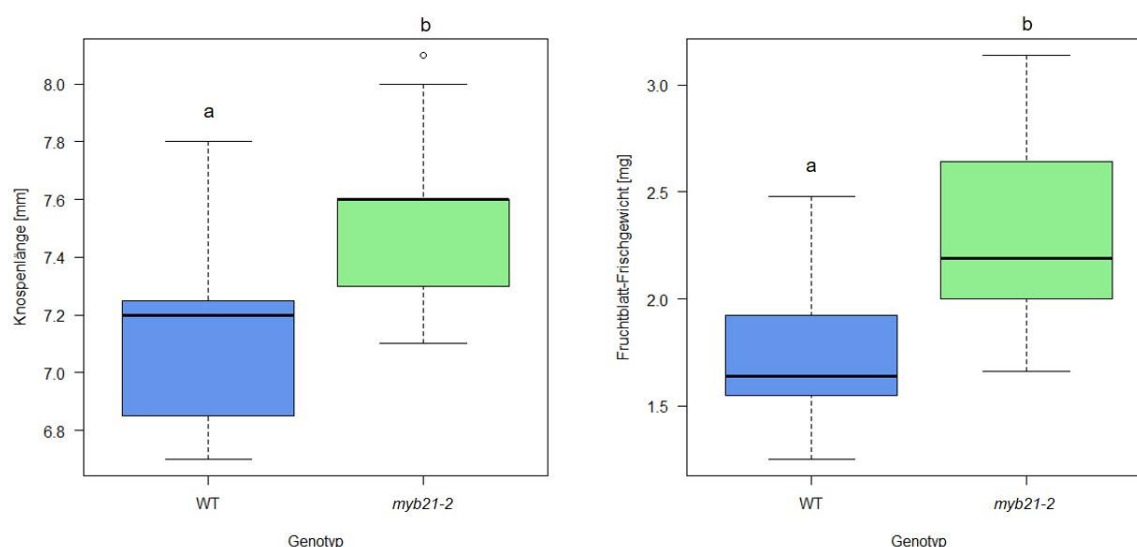
- Szecsí J, Joly C, Bordji K, Varaud E, Cock JM, Dumas C, Bendahmane M (2006) BIGPETALp, a bHLH transcription factor is involved in the control of Arabidopsis petal size. *The EMBO journal* 25 (16):3912-3920. doi:10.1038/sj.emboj.7601270
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science (New York, NY)* 319 (5868):1384-1386. doi:10.1126/science.1151461
- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Aina T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, 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 Physiol* 139 (3):1268-1283. doi:10.1104/pp.105.067058
- Thatcher LF, Cevik V, Grant M, Zhai B, Jones JD, Manners JM, Kazan K (2016) Characterization of a JAZ7 activation-tagged Arabidopsis mutant with increased susceptibility to the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *J Exp Bot* 67 (8):2367-2386. doi:10.1093/jxb/erw040
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448 (7154):661-665. doi:10.1038/nature05960
- Thireault C, Shyu C, Yoshida Y, St Aubin B, Campos ML, Howe GA (2015) Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in Arabidopsis. *Plant J* 82 (4):669-679. doi:10.1111/tpj.12841
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (8):4698-4703. doi:10.1073/pnas.96.8.4698
- Tomato Genome C (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485 (7400):635-641. doi:10.1038/nature11119
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* 19 (3):309-319
- van der Leede-Plegt LM, van de Ven BC, Bino RJ, van der Salm TP, van Tunen AJ (1992) Introduction and differential use of various promoters in pollen grains of

- Nicotiana glutinosa* and *Lilium longiflorum*. Plant Cell Rep 11 (1):20-24. doi:10.1007/bf00231833
- Varaud E, Brioude F, Szecsi J, Leroux J, Brown S, Perrot-Rechenmann C, Bendahmane M (2011) AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates Arabidopsis petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. Plant Cell 23 (3):973-983. doi:10.1105/tpc.110.081653
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D, Guedon Y, Armitage L, Picard F, Guyomarc'h S, Cellier C, Parry G, Koumproglou R, Doonan JH, Estelle M, Godin C, Kepinski S, Bennett M, De Veylder L, Traas J (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. Mol Syst Biol 7:508. doi:10.1038/msb.2011.39
- Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C (2008) Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. New Phytol 177 (1):60-76. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02254.x
- Wang H, Schauer N, Usadel B, Frasse P, Zouine M, Hernould M, Latche A, Pech JC, Fernie AR, Bouzayen M (2009) Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. Plant Cell 21 (5):1428-1452. doi:10.1105/tpc.108.060830
- Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O (2006) The wound response in tomato--role of jasmonic acid. J Plant Physiol 163 (3):297-306. doi:10.1016/j.jplph.2005.10.014
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. Ann Bot 111 (6):1021-1058. doi:10.1093/aob/mct067
- Wasternack C, Strnad M (2018) Jasmonates: News on Occurrence, Biosynthesis, Metabolism and Action of an Ancient Group of Signaling Compounds. Int J Mol Sci 19 (9). doi:10.3390/ijms19092539
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S (2011) A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. PLoS One 6 (2):e16765. doi: 10.4161/bbug.3.1.18223

- Werner S, Engler C, Weber E, Gruetzner R, Marillonnet S (2012) Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioeng Bugs* 3 (1):38-43. doi:10.1371/journal.pone.0016765
- Wild M, Daviere JM, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P, Achard P (2012) The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* 24 (8):3307-3319. doi:10.1105/tpc.112.101428
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *never-ripe*. *Science (New York, NY)* 270 (5243):1807-1809
- Wilson ZA, Song J, Taylor B, Yang C (2011) The final split: the regulation of anther dehiscence. *J Exp Bot* 62 (5):1633-1649. doi:10.1093/jxb/err014
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2 (8):e718. doi:10.1371/journal.pone.0000718
- Wu H, Ye H, Yao R, Zhang T, Xiong L (2015) OsJAZ9 acts as a transcriptional regulator in jasmonate signaling and modulates salt stress tolerance in rice. *Plant Sci* 232:1-12. doi:10.1016/j.plantsci.2014.12.010
- Wu J, Wang F, Cheng L, Kong F, Peng Z, Liu S, Yu X, Lu G (2011) Identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) genes in *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Reports* 30 (11):2059. doi:10.1007/s00299-011-1113-z
- Xiao Y, Chen Y, Charnikhova T, Mulder PP, Heijmans J, Hoogenboom A, Agalou A, Michel C, Morel JB, Dreni L, Kater MM, Bouwmeester H, Wang M, Zhu Z, Ouwerkerk PB (2014) OsJAR1 is required for JA-regulated floret opening and anther dehiscence in rice. *Plant Mol Biol* 86 (1-2):19-33. doi:10.1007/s11103-014-0212-y
- Xu W, Fiume E, Coen O, Pechoux C, Lepiniec L, Magnani E (2016) Endosperm and Nucellus Develop Antagonistically in Arabidopsis Seeds. *Plant Cell* 28 (6):1343-1360. doi:10.1105/tpc.16.00041
- Yan H, Yoo MJ, Koh J, Liu L, Chen Y, Acikgoz D, Wang Q, Chen S (2014) Molecular reprogramming of Arabidopsis in response to perturbation of jasmonate signaling. *J Proteome Res* 13 (12):5751-5766. doi:10.1021/pr500739v

- Yan J, Yao R, Chen L, Li S, Gu M, Nan F, Xie D (2018) Dynamic Perception of Jasmonates by the F-Box Protein COI1. *Mol Plant* 11 (10):1237-1247. doi:10.1016/j.molp.2018.07.007
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F, Wang Z, Xie D (2009) The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* 21 (8):2220-2236. doi:10.1105/tpc.109.065730
- Yang XY, Li JG, Pei M, Gu H, Chen ZL, Qu LJ (2007) Over-expression of a flower-specific transcription factor gene *AtMYB24* causes aberrant anther development. *Plant Cell Rep* 26 (2):219-228. doi:10.1007/s00299-006-0229-z
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2 (7):1565-1572. doi:10.1038/nprot.2007.199
- Ziegler J, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Hamberg M, Grimm R, Ganai M, Wasternack C (2000) Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J Biol Chem* 275 (25):19132-19138. doi:10.1074/jbc.M002133200

7 Anhang



Anhang Abb. 1: **Knospenlänge und Fruchtblatt-Gewicht von *myb21-2* im Blütenstadium 3**
 Boxplots zeigen Mediane (Querbalken), 25 - 75 % Interquartilabstände (Boxen) und Datenverteilung (Fehlerbalken). Ausreißer (> 1,5-facher Interquartilabstand) sind als Punkte dargestellt. Die Länge der gesamten Knospe von Basis bis Narbe sowie das Frischgewicht des Fruchtblattes wurde von Wildtyp (WT; n = 15) und *myb21-2* (n = 20) bestimmt. Signifikante Unterschiede wurden mittels 1-faktorieller ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test ermittelt ($p \leq 0,05$) und sind durch unterschiedliche Buchstaben dargestellt.

Anhang Tab. 1: **Validierung der RNASeq-Daten für eine Auswahl an in *jai1-1* und *myb21-2* im Vergleich zum Wildtyp herunterregulierten Genen**

Für die qPCR wurden unabhängige Fruchtblatt-Proben des Blütenstadiums 3 des Wildtyps, *jai1-1* und *myb21-2* verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Transkriptlevel bezogen auf TIP41 (n = 3, \pm Standardfehler). Der Signifikanztest erfolgte mittels 1-faktorieller ANOVA mit anschließendem TUKEY-Test mit $p \leq 0,05$; wobei fett gedruckte Werte einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp zeigen.

Gene	WT	<i>jai1-1</i>	<i>myb21-2</i>
<i>MYB21</i>	7,45 \pm 0,33	0,67 \pm 0,12	1,02 \pm 0,19
<i>MYB24</i>	0,43 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
<i>MYB TF (490)</i>	1,99 \pm 0,26	0,27 \pm 0,05	1,01 \pm 0,73
<i>FSM1 (MYB)</i>	0,99 \pm 0,03	0,55 \pm 0,14	0,40 \pm 0,06
<i>bHLH-TF (560)</i>	1,76 \pm 0,09	0,38 \pm 0,03	0,43 \pm 0,04
<i>bHLH-TF (690)</i>	1,52 \pm 0,11	0,59 \pm 0,10	0,53 \pm 0,06
<i>ERF1a</i>	2,36 \pm 0,15	0,91 \pm 0,07	1,50 \pm 0,80
<i>ERF2a</i>	2,49 \pm 0,13	0,48 \pm 0,07	0,23 \pm 0,02
<i>ERF2b</i>	2,87 \pm 0,19	1,57 \pm 0,22	1,52 \pm 0,32
<i>Auxin-Efflux-Transporter</i>	3,24 \pm 0,15	1,59 \pm 0,07	0,93 \pm 0,18
<i>SAUR-Protein</i>	2,42 \pm 0,17	0,35 \pm 0,01	0,44 \pm 0,10

Gene	WT	<i>jai1-1</i>	<i>myb21-2</i>
UDP-Glukosyltransferase (490)	4,68 ± 0,54	0,49 ± 0,05	0,57 ± 0,10
UDP-Glukosyltransferase (500)	4,21 ± 0,59	1,84 ± 0,41	1,13 ± 0,04
Auxin-reprimiertes Protein	54,62 ± 7,18	24,08 ± 1,31	26,07 ± 7,61
Cellulose-Synthase (450)	39,38 ± 3,02	16,80 ± 1,25	22,20 ± 3,54
Cellulose-Synthase (640)	2,29 ± 0,30	0,76 ± 0,17	0,62 ± 0,02
Actin-depolymerisierender Faktor	13,01 ± 0,55	3,14 ± 0,13	2,25 ± 0,31
Aquaporin	0,94 ± 0,27	0,33 ± 0,00	0,27 ± 0,15

Anhang Tab. 2: Validierung der RNASeq-Daten für eine Auswahl an in *jai1-1* und *myb21-2* im Vergleich zum Wildtyp hochregulierten Genen

Für die qPCR wurden unabhängige Fruchtblatt-Proben des Blütenstadiums 3 des Wildtyps, *jai1-1* und *myb21-2* verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Transkriptlevel bezogen auf TIP41 (n = 3, ± Standardfehler). Der Signifikanztest erfolgte mittels 1-faktorieller ANOVA mit anschließendem TUKEY-Test mit $p \leq 0,05$; wobei fett gedruckte Werte einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp zeigen.

Gene	WT	<i>jai1-1</i>	<i>myb21-2</i>
<i>MYB12</i>	1,27 ± 0,11	3,12 ± 0,56	3,42 ± 0,51
<i>bHLH-TF</i> (490)	0,20 ± 0,07	0,95 ± 0,19	0,47 ± 0,05
<i>AP2-ähnlicher ERF</i> (290)	0,07 ± 0,07	0,23 ± 0,10	0,29 ± 0,09
<i>AUX/IAA14</i>	40,18 ± 4,22	47,97 ± 6,41	46,50 ± 1,57
<i>ARF4</i>	2,83 ± 0,25	9,90 ± 0,97	6,94 ± 0,43
<i>Cytokinin-Dehydrogenase 1</i>	0,20 ± 0,04	2,74 ± 0,59	0,69 ± 0,15
UDP-Glukosyltransferase (870)	0,22 ± 0,04	0,38 ± 0,10	0,37 ± 0,12
<i>GA 2-Oxidase</i>	0,18 ± 0,06	0,45 ± 0,13	0,38 ± 0,02
<i>GA 3-β-Hydroxylase</i>	0,98 ± 0,12	3,06 ± 0,39	2,40 ± 0,60
<i>GA 20-Oxidase-3</i>	0,17 ± 0,04	0,42 ± 0,16	0,50 ± 0,09
<i>GA-Rezeptor GID1L2</i>	0,17 ± 0,04	0,53 ± 0,11	0,38 ± 0,05
<i>Expansin 45</i>	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,05	0,22 ± 0,09
<i>Xyloglucan-Endotransglukosylase</i>	0,60 ± 0,04	2,81 ± 0,57	2,19 ± 0,24
<i>Pektin-Acetylerase</i>	7,45 ± 1,14	26,09 ± 3,12	11,72 ± 2,09
<i>Serine-Carboxypeptidase S10</i>	1,73 ± 0,07	2,27 ± 0,13	2,41 ± 0,24
<i>Pistil-specific extensin-like protein</i>	14,24 ± 0,88	67,15 ± 10,81	61,32 ± 1,44
<i>Selbstinkompatibilitätsprotein S1</i>	3,73 ± 0,31	21,32 ± 5,94	36,44 ± 6,84

Anhang Tab. 3: **GA-Gehalte im Fruchtblatt des Blütenstadiums 3** von Wildtyp (WT), *jai1-1* und *myb21-2* (n=5, ± Standardfehler)

Gibberellin	WT (ng/g FG)	<i>jai1-1</i> (ng/g FG)	<i>myb21-2</i> (ng/g FG)
GA₁	0,367 ± 0,050	0,226 ± 0,091	0,194 ± 0,026
GA₄	0,507 ± 0,064	0,917 ± 0,031	0,509 ± 0,069
GA₅	0,139 ± 0,013	0,156 ± 0,014	0,107 ± 0,029
GA₆	0,512 ± 0,043	0,565 ± 0,041	0,636 ± 0,033
GA₇	0,199 ± 0,029	0,189 ± 0,026	0,194 ± 0,016
GA₂₀	0,246 ± 0,024	0,084 ± 0,036	0,218 ± 0,064
GA₂₄	1,069 ± 0,092	1,110 ± 0,086	0,675 ± 0,121
GA₂₉	0,748 ± 0,078	1,829 ± 0,397	0,877 ± 0,040
GA₃₄	1,008 ± 0,035	1,309 ± 0,069	0,799 ± 0,013
GA₄₄	0,222 ± 0,057	0,606 ± 0,103	0,213 ± 0,040
GA₅₁	0,186 ± 0,024	0,236 ± 0,076	0,244 ± 0,035
GA₈	2,750 ± 0,091	8,659 ± 0,538	3,235 ± 0,500
GA₉	5,484 ± 0,960	7,903 ± 1,014	5,336 ± 0,718
GA₁₉	6,414 ± 0,635	9,946 ± 0,578	9,520 ± 1,033
GA₅₃	2,525 ± 0,311	4,877 ± 0,340	4,519 ± 0,574

Anhang Tab. 4: **Primersequenzen zur Genotypisierung** von *jai1-1*, TILLING- und CRISPR/Cas9-Linien sowie Überexpressionslinien von *MYB14* und *MYB21*

	Sequenz [5'→3']
<i>COI1 (Solyc05g052620)</i>	
WT_COI1_for	CCA TGG AGT CCA TCA CCT AAC AGT
jai1_for	GTG GTC AGA TCA GAG CCC TCT ATT
WT/jai1_rev	GTG GAG ACG ATA TGT TGA GAC TAA
<i>MYB21 (Solyc02g067760)</i>	
7979/myb21-1_for	ATGGATAAAATATGCAACTC
7979_rev	TAACTCAAACCCTATCACTC
myb21-1_rev	GTGCCTTAGATTATATTCTC
8245_for	GAGGGGTAATATTACACCTGAAGAACAACCTTTTGATTAA
8245_rev	TCGAATACTTGATGGACAAAATTTTAC
myb21-2/ 3_for	TCGAAAAAATAAAAGTTACGGCG
myb21-2/ 3_rev	TATGGAGTGGCTCTCTTAGTC
Cas9_for	CCACCAAGACTTGACTTTGC
Cas9_rev	TCCTTTTCGATGAAGGACTGG
<i>MYB14 (Solyc06g083900)</i>	
3551/2998_for	GAATTTTTCTTCAACATTATA

	Sequenz [5'->3']
3551/2998_rev	TCATAATTCAGGCAATTCTAAC
crisprMYB14_for	TCAGCTCCAAGTTCCAAGTG
crisprMYB14_rev	CGAATGGAACATTACGCTGC
Überexpressionslinien	
35S_for	CGAGTAACAATCTCCAGGAG
OCS_rev	CATGCGATCATAGGCTTCTC

Anhang Tab. 5: Primersequenzen für qPCR-Analysen

Gen	Sequenz [5'->3']
Referenzgen	
<i>TIP41</i> (<i>Solyc10g049850</i>)	for_ TCA GTG GGA GGA TTG TAA GG rev_ GGT TCT TTA GAC GCC AAT GC
<i>Nb19339_L23</i> (<i>N. benthamiana</i>)	for_ GGA TGG CCC ATG GCT TAT TC rev_ CAA TAG CAG CCC AAC TCA AC
JA-regulierte Gene im Staubblatt (Fluidigm-Expressionsanalyse)	
<i>JAZ2</i> (<i>Solyc12g009220</i>)	for_ CTG ATC AAT CTG GTG TGA GTT TTG rev_ CAG AAG GCT GTG GCA TTG AC
<i>JAZ9</i> (<i>Solyc08g036640</i>)	for_ CAA GTA GAG GAA TGG AGA TG rev_ ATG GTG ATG AAG GCT CAG AC
<i>Leucin-Aminopeptidase</i> (<i>Solyc12g010040</i>)	for_ CCT GGT AAT GGC GGT GCT ATA A rev_ TCG AGA TGC AAC CAC TGA ACC
<i>Threonin-Deaminase</i> (<i>Solyc09g008670</i>)	for_ CTT TAT GCC GTT ACC GTA ATC AGG rev_ GGA ATC TGG AAT CCC ATC AAC A
<i>MYB21</i> (<i>Solyc02g067760</i>)	for_ TGC TGG TCT CAA ACG TAC TG rev_ TAG CCA TCG GAG TCT ACA AC
<i>MYB14</i> (<i>Solyc06g083900</i>)	for_ TCC TAA TTG GCG TGC ACT TC rev_ TCC GCA CCT TAA TAG ACC TG
<i>ACX1A</i> (<i>Solyc08g078390</i>)	for_ CAA ATG CTG TAT CAC TGG TTG ATG rev_ CCA TCA TAA CGT CCA AGA ATT GAA C
<i>Pirin</i> (<i>Solyc09g098160</i>)	for_ CCT GGA ATG CCT TCC TCT AC rev_ AGA ACC AAA CGC TCC CTC TC
<i>AOX1b</i> (<i>Solyc08g075550</i>)	for_ CGG GAC CTA AAT CAC TTT GC rev_ AAC TCA TGC CCT TGA CAC TG

Gen	Sequenz [5'->3']
<i>Metacaspase 7</i> (<i>Solyc10g081300</i>)	<i>for_</i> AGC CAC TTA AAC AAG ATG AG <i>rev_</i> TCT TCA TTA GCT TGA CAT CC
<i>Subtilisin-like Protease</i> (<i>Solyc01g087800</i>)	<i>for_</i> TGA TGG TCT GCC AGA AAT CC <i>rev_</i> GGG CCT ACA AAT TCC TTT CC
<i>Xyloglucan-endotransglucosylase-Hydrolase3</i> (<i>Solyc03g093130</i>)	<i>for_</i> CCA AAG AAC CAA CCC ATG AG <i>rev_</i> AGC CCA ATC ATC AGC ATT CC
<i>Endo-1,4-β-Glucanase (Cel1)</i> (<i>Solyc08g081620</i>)	<i>for_</i> GGA TGG CCC ATG GCT TAT TC <i>rev_</i> CAA TAG CAG CCC AAC TCA AC
<i>MADS-Box MPF2-like TF</i> (<i>Solyc04g076280</i>)	<i>for_</i> GCCTTTAGTGACTGACATGG <i>rev_</i> TAGACTCAGATGATTGGCCC
<i>MADS-Box TF</i> (<i>Solyc04g076700</i>)	<i>for_</i> GAACTTGGAGAACCAACTGG <i>rev_</i> TTCTTACACGAACACCACGG
<i>ACC-Oxidase 5</i> (<i>Solyc07g026650</i>)	<i>for_</i> GGACAATGTGAAGCAGTTCCG <i>rev_</i> GCTTCTTCATGTTGGCTTCG
<i>IAA-Aminosäuren-Hydrolase</i> (<i>Solyc05g006220</i>)	<i>for_</i> ATAGTTGCATCTAGGGCTGG <i>rev_</i> TGTGGTATAGCAGCATGTCC
<i>Tryptophan-Synthase</i> (<i>Solyc10g005320</i>)	<i>for_</i> GACTAGGAAACAAGCCATGG <i>rev_</i> AACACATGTGGTTTGCCACC
<i>ACC-Oxidase</i> (<i>Solyc02g036350</i>)	<i>for_</i> TCA GTG GTC TCC AAC TAC TC <i>rev_</i> GCA TCG GTG GAA CAT CAA TC
<i>RIN MADS-Box TF</i> (<i>Solyc05g012020</i>)	<i>for_</i> CAA ACA TCA TGG CAT TGT GG <i>rev_</i> ATG AGA AGG CTG TTC ATG TC
<i>ETR6</i> (<i>Solyc09g089610</i>)	<i>for_</i> GCT GCA GTG GTT GAA GAA TC <i>rev_</i> TTC TGT TCC GTC AAC CTG TC
<i>AP2/ERF TF</i> (<i>Solyc04g071770</i>)	<i>for_</i> CTT CTT TCA GCC ACA AAC TC <i>rev_</i> GCT GTT GCT ACT GCT ATT GC
<i>MYB-like TF</i> (<i>Solyc05g052610</i>)	<i>for_</i> GACGAGACTACACCAAATCG <i>rev_</i> CAAGAACTGATTTCCCAGGG
<i>MYB-TF AN2</i> (<i>Solyc10g086250</i>)	<i>for_</i> CATCTTGTTCCCTGCTAGAGC <i>rev_</i> CTGCAACTCTTTTCGACATCG
<i>GRAS-family TF</i> (<i>Solyc02g092570</i>)	<i>for_</i> TGCTAGTAGATGAAGACGCG <i>rev_</i> CCGATCTTAATCTGCACACC
JA- and MYB21-regulierte Gene (hochreguliert in den Mutanten)	
<i>MYB12</i>	<i>for_</i> TGA TGA GTT AGT ATG GCC AAC G

Gen	Sequenz [5'->3']
(<i>Solyc01g079620</i>)	rev_ GTG TCA GTA TCG TCC CAT TGT G
bHLH-TF (<i>Solyc01g107490</i>)	for_ TGC CAG TAG AGG TGA GTG TC rev_ ATT GTT CAT CAT GGC GGC AG
<i>Pistil specific extensin like Protein</i> (<i>Solyc02g078040</i>)	for_ GCA CCA CCA TCT CCA ATG AC rev_ AAG GCC CCA CAT TAA ACA GC
Xyloglucan-endotransglucosylase (<i>Solyc02g080160</i>)	for_ AAA CCC TTA CCC TGC TTG TG rev_ TGA TCC CAC CAG TGC TGT G
GA 2-Oxidase (<i>Solyc05g053340</i>)	for_ AAT GGT GTA CTT TGG TGC CC rev_ TGT GTG GTG TTG TAG TGACC
<i>Peptidase S10</i> (<i>Solyc06g017860</i>)	for_ TCC TTA GGG TCC ATG ATG CAG rev_ GTG CTG CCT TAG GTT GAT CC
<i>Expansin 45</i> (<i>Solyc06g051800</i>)	for_ CCA TTG AGC CGT AAT TGG GG rev_ GTG ATT GAC CAG TTA AAA CCG C
GA 3- β -Hydroxylase (<i>Solyc06g066820</i>)	for_ TAG GGC AGT GAC ATG GAG TG rev_ ACG GAT GAA AGT GCC TTG TC
AP2-like ERF (<i>Solyc07g018290</i>)	for_ CAC CTT CTC TCC ATT CGT TCC rev_ TGG TCC TAG GTC ATT CTT TGT AC
Pectinacetylerase (<i>Solyc08g014380</i>)	for_ GTC AGT GTG GTG AAT AAT GTG AC rev_ GCC TGT CAA AGT ACC AAT CTC C
<i>AUX/IAA14</i> (<i>Solyc09g083290</i>)	for_ TGG AGA TTG GAT GCT TGT TGG rev_ ACG CTT GCA TGA ATC AAC AAA C
Selbstinkompatibilitätsprotein (<i>Solyc09g091300</i>)	for_ AAC TTT TGG TGG GGT TCA ATG rev_ GCC TGG GTC ATC AAA CAC TG
<i>GID1L2</i> (<i>Solyc10g050880</i>)	for_ GGA GAC ACA AGG GGA GGA TC rev_ AGC AGC CTT CTC ACA ATT TGG
<i>Cytokinin-Dehydrogenase 1</i> (<i>Solyc10g079870</i>)	for_ TAC TTG CTC CAG GAC AGA GG rev_ CAT GTT CAC AGT CTG CCGTC
UDP-Glucosyltransferase Familie1 (<i>Solyc10g085870</i>)	for_ CTG TGG ATG GAA TTC GAG CC rev_ CCA AGT GAT CAT GGC CAA GC
<i>ARF4</i> (<i>Solyc11g069190</i>)	for_ ACG ACT TGC TGG TTG AGT TG rev_ GTG TAC AAG ATT CGC CAC CC
GA 20-Oxidase-3 (<i>Solyc11g072310</i>)	for_ CAG ATT TCA CAT GGC CAA CC rev_ GTT TGT AGG GTG TTC ATA TCA GC
JA- und MYB21-regulierte Gene (herunter reguliert in den Mutanten)	
<i>Actin-depolymerisierender Faktor5</i>	for_ ACG CAA CAT CAA AAG CAG GG

Gen	Sequenz [5'->3']
(<i>Solyc01g111380</i>)	rev_ CTC AGT TGG ATC CGT TGC TTG
bHLH-TF (<i>Solyc02g062690</i>)	for_ TCC ACC AAC AGT AGC AGT TCC rev_ GCT TGC TGG TGT TGG ATC ATG
Auxin-reprimierendes Protein (<i>Solyc02g077880</i>)	for_ CAC CCA GGG AGC AAT TTA GC rev_ GGA GCG TTA GGG TGA GAA GG
PIN-Protein (<i>Solyc02g082450</i>)	for_ GGG TTC CTT CCA GCA GAT CC rev_ GTG GAA CGG TGT ACT GAA GC
<i>MYB24</i> (<i>Solyc02g086690</i>)	for_ CTC GAT CCG CTG GTT TGA AG rev_ TTT CCC CTC CGA ACA TCA GG
Cellulose-Synthase (<i>Solyc03g005450</i>)	for_ TGT TTG GTC AAG TGT TCC TCT C rev_ TGC TTC CTT TGT CTC TCC TC
bHLH-TF (<i>Solyc03g113560</i>)	for_ TGC AAG ATT TGG TTC CTG GAT G rev_ CTT GAC GCT GTA GTG ACT GG
Aquaporin (<i>Solyc03g117050</i>)	for_ TGT AGG AGC CAC TGT CAT GC rev_ TTG AAG CCC CAG TTG TCT CC
MYB-TF (<i>Solyc07g052490</i>)	for_ GTC TCA CCT GAT TCG ACC CG rev_ GAG GTT TCT TCG TTG GTA GTC TC
<i>ERF1a</i> (<i>Solyc08g007230</i>)	for_ AGG CGG CGT ATC GAA TTA GG rev_ GCC CGA ATT AAC CCT CAA CG
SAUR (<i>Solyc08g079150</i>)	for_ CGT GGG TGA GAA GGA GGA TG rev_ CCA TCT CTG CCT CCC TCA AC
Cellulose-Synthase (<i>Solyc08g082640</i>)	for_ ACG TAA CAA GCA AAG TAG TCG rev_ TGA AAC AAC CCC AAA CTC GAA AG
<i>ERF2b</i> (<i>Solyc09g075420</i>)	for_ CCC CAA TGA AGA TGA CGA CC rev_ AAG CAA TGT TCA AGG GAG GG
UDP-Glucosyltransferase Familie1 (<i>Solyc09g092490</i>)	for_ TGT TTG GAA GAA TGG CGT CAG rev_ CGC TGT TTC CCA TCA CGA TC
UDP-Glucosyltransferase Familie1 (<i>Solyc09g092500</i>)	for_ CTC ATT GGA CAG ATC AAG GGA C rev_ TCA CTC TCA TCC TGA CAC CTG
<i>FSM1</i> (MYB) (<i>Solyc10g052470</i>)	for_ TCT TCT GGA TCA TGG ACT GCG rev_ CCA ATG CCT TCT CAA ACG CC
<i>ERF2a</i> (<i>Solyc12g056590</i>)	for_ ACA TCA GCA ACT TCT TCA ACG TC rev_ GGT GCT ACT TGT GTT GGT TCC
Überexpressionslinien	
<i>MYB21_endogen</i> (3'-Ende)	for_ GCATGGAGGATATCTGGTC

Gen	Sequenz [5'->3']
(<i>Solyc02g067760</i>)	rev_ CCAAACATACTTGATTTAATCTCC
MYB14_endogen (3'-Ende)	for_ CAAGATCTAATGAGTTGATGTTAG
(<i>Solyc06g083900</i>)	rev_ CTCAACATTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTGG
Flag-Tag_rev	rev_ CTGCTGCAGCGTCGAGGTC

Anhang Tab. 6: Primersequenzen für **Golden-Gate-Klonierungen**

	Sequenz [5'->3']
pICH41308_for	AGC GAG GAA GCG GAA GAG CG
<i>MYB21 (Solyc02g067760)</i>	
MYB21g+CDS_for1	TTTGAAGACAAAATGGATAAAATATGCAACTCTCAAGATG
MYB21-CDS_rev1	TTTGAAGACTTTGAGGCCAGCAGATTTAGC
MYB21g+CDS_for2	TTTGAAGACGCCTCAAACGTAAGGAAAAAGTTGTAGACTC
MYB21NT-CDS_rev	TTTGAAGACAACGAA GAGGCTTGAAAATTAGTGCCAAATTTTC
MYB21g_rev1	TTTGAAGACACTGAGGCCTAAAGAAACAAAGACATAGATATAT
MYB21g_rev2	TTTGAAGACAATCTGATTAGTCCACTCAACAATAAAAAACACATGG
MYB21g_for3	TTTGAAGACTTCAGATTCAACTGAATCCATTACTTTTCAG
MYB21g_rev3_ohneStopp	TTTGAAGACAACGAACCATCTCCATTAAGCAATTGCATTGACC
SIMYB21pro1b	TTGGTCTCAACATGGAGGAGACAATGCTCACGTATTCAAATCTC
SIMYB21pro2	TTGGTCTCAACAAGGCAACATATAGTGTGTGGTTTCATCC
SIMYB21pro3	TTGGTCTCAACATTGCCTCCGAATGTGGAGTATGTAC
SIMYB21pro4	TTGGTCTCAACAATGAGAGAATATTGAAGATATGTGGTACTTTGTG
SIMYB21pro5	TTGGTCTCAACATCTCATCTTCTCTCTACTTTTTTTTTTTTTGGTTT ACTTTTTCTTTCATCTTT
SIMYB21pro6	TTGGTCTCAACAACATTCTTTTTTTTATAATTTTTTTTTTTTTAAAAAAA AAAAGATGAAGAGAAAAAGTAAACC
crispr-ex1_for	TTG GTC TCA ATT GAG GAA AGG GCC TTG GAC TAG TTT TAG AGC TAG AAA TAG CAA G
crispr-ex2-ts1_for	TTGGTCTCAATTGATTATCTTCGACCTGATGTCGTTTTAGAGCTAGA AATAGCAAG
crispr-ex2-ts2_for	TTGGTCTCAATTGATGGAACCTACATGCTAAGTGGTTTTAGAGCTAGA AATAGCAAG
critarev	ATGTACGGCCAGCAACGTCG
<i>MYB14 (Solyc06g083900)</i>	
MYB14g+CDS_for1	TTT GAAGAC AA A ATGGGGAGATCTCCTTGC
MYB14g+CDS_rev1	TTT GAAGAC AT CAGGCCTCAAGTAATTAGTCC
MYB14g+CDS_for2	TTT GAAGAC GG CCTGATATTAAGCGAGG
MYB14g+CDS_rev2_ohneStopp	TTTGAAGAC AA CGAACCTAATTCAGGCAATTCTAACATCAACTC
crispr-MYB14-	TTG GTC TCA ATT GAA CCC CAA TTT CTC ACA GCA GTT TTA GAG

	Sequenz [5'->3']
plCH41308_for	AGC GAG GAA GCG GAA GAG CG
ts1_for	CTA GAA ATA GCA AG
crispr-MYB14- ts2_for	TTG GTC TCA ATT GTT TGG AAG TGC ACG CCA ATT GTT TTA GAG CTA GAA ATA GCA AG
<i>Cel1 (Solyc08g081620)</i>	
Cel1pro_for1	TTT GAA GAC AA GGAG AAG GGG TAA ATT TGG TGA AAT TAG TAA TGG AG
Cel1pro_rev1	TTT GAAGAC AA GTCTCTTGTAAAGAAAGTTGGAGAAGG
Cel1pro_for2	TTT GAAGAC AA AGACGTTGTAAAGAAAGTTAATGAATAAGGC
Cel1pro_rev2	TTT GAAGAC AA GCAGAGATACCTTAGAGTTAGG
Cel1pro_for3	TTT GAAGAC AA CTGCCACAATGTTGGGATTGC
Cel1pro_rev3	TTT GAA GAC AAC ATT CAA GTG AAT CAT TGT AAT CTT GAG CAA TAA TAG
<i>Cl111 (Sorkina et al., 2011)</i>	
LepC3pro_for	TTT GAA GAC AAG GAG ATG ATT TGC AGA TGC ACT GTA
LepC3pro_rev	TTT GAA GAC AAC ATT CAT TTT TTT CTA TTT CAT TCT TTC AGA TTT TAA GCA G
<i>JAZ9 (Solyc08g036640)</i>	
JAZ9_for	TTTGAAGACAAA ATGAGAAGAAATTGTAATTTGGAGCTCAC
JAZ9_rev	TTTGAAGACAACGAA GATTTGTGATATGGCGAAGTTGCTTG

Anhang Tab. 7: Primersequenzen für Gateway-Klonierungen

	Sequenz [5'->3']
<i>JAZ1 (Solyc07g042170)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTTCATCGGAGATTGTG GAT
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAGTATTGCTCAGTTTTCACT GCA
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTG ATGGCTTCATCGGAGATTGTGGAT
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTAGTATTGCTCAGTTTTCACTGCA
<i>JAZ2 (Solyc12g009220)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGGTCATCGGAAAATATG
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAGAAATATTGCTCAGTTTTAA C
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTGATGGGGTCATCGGAAAATATG
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTAGAAATATTGCTCAGTTTTAAC
<i>JAZ3 (Solyc03g122190)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTGCAATTTATGTGACGCT CG
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTATAACTTGAAATTGAGATCG AGC

Sequenz [5'→3']	
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTGATGTCTGAATTTATGTGACGCTCG
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTATAACTTGAAATTGAGATCGAGC
<i>JAZ4 (Solyc12g049400)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCAAATAGGCAACTTTGTT C
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAGAAATTGAGATCAAATGA TC
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTGATGTCAAATAGGCAACTTTGTTC
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTAGAAATTGAGATCAAATGATC
<i>JAZ5 (Solyc03g118540)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAGAGATTTTCATGGGG TTGA
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTACTTGACCAAAGTATTATG TG
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTGATGGAGAGAGATTTTCATGGGGTTGA
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTACTTGACCAAAGTATTATGTG
<i>JAZ6 (Solyc01g005440)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAGGGACTTTATGGGA TTG
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAGGTCTCCTTACCGGCTAAC AG
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTGATGGAGAGGGACTTTATGGGATTG
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTAGGTCTCCTTACCGGCTAACAG
<i>JAZ7 (Solyc11g011030)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATTCAAGAATGGAGATA GAT
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGTTTTCCCAATGAACGCTT GA
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTGATGGATTCAAGAATGGAGATAGAT
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGATTAGTTTTCCCAATGAACGCTTGA
<i>JAZ8 (Solyc06g068930)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCATTGGTCATATTCTAAC AG
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAATTTGCAGCAGGAAGTGAA
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTGATGCATTGGTCATATTCTAACAG
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTAATTTGCAGCAGGAAGTGAA
<i>JAZ9 (Solyc08g036640)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGAAGAAATTGTAATTTG GAG
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTATTTGTGATATGGCGAAGTT
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTGTGATGAGAAGAAATTGTAATTTGGAG
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTATTTGTGATATGGCGAAGTT
<i>JAZ10 (Solyc08g036620)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGAAGAAAGTGTAAATTTG GAA

	Sequenz [5'->3']
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAGTGATGATATGGAGAAGTTAT
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAAGTTGTGATGAGAAGAAAGTGTAAATTTGGAA
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTAGTGATGATATGGAGAAGTTAT
<i>JAZ11 (Solyc08g036660)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGAAGAAATTGTAATTTGGAG
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAGTGATGATATGGCGAAGTT
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAAGTTGTGATGAGAAGAAATTGTAATTTGGAG
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGACTAGTGATGATATGGCGAAGTT
<i>JAZ13 (Solyc01g103600)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCGCATTCCGAGGCATGATGATA
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTATTCTGCGCATGAGTTATGTTA
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAAGTTGTGATGCGCATTCCGAGGCATGATGATA
rev-attB4	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGATTATTCTGCGCATGAGTTATGTTA
<i>MYB21 (Solyc02g067760)</i>	
for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATAAAATATGCAACTCTCAA
rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAATCTCCATTAAGCAATTGCAT
rev-attB2 ohne Stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATCTCCATTAAGCAATTGCAT
for-attB3	GGGGCAACTTTGTATAATAAAAGTTGTGATGGATAAAATATGCAACTCTCAA
rev-attB4 ohne Stop	GGGGCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGATTAATCTCCATTAAGCAATTGCAT
Flag-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACTTATCGTCATCGTCCTTA

Anhang Tab. 8: **Primersequenzen für die Generierung und Identifikation transgener A. thaliana-Pflanzen** (Gateway-Klonierung)

	Sequenz [5'->3']
<i>MYB21 (Solyc02g067760)</i>	
MYB21g-Flag_attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATAAAATATGCAACTCTCAAGATG
MYB21g-Flag_attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACTTATCGTCATCGTCCTTATAATC
<i>A. thaliana MYB21 (At3g27810)</i>	
AtMYB21g_attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAAAGAGGAGGAGGAAG
AtMYB21g_attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAATTACCATCAATAAATGCATTGATGAC

	Sequenz [5'->3']
myb21-5_for	AAGTAAATAAAGAATAATAACAAAAAAAAATGGAGA
myb21-5_rev	GCATATTGGCAGCTTCAGAGT

Danksagung

Allen voran danke ich **Prof. Dr. Bettina Hause** für ihre unablässige Unterstützung und wissenschaftliche Führung sowie ihre Effizienz, Freude für das Thema, ihr Vertrauen in mich und die Gewissheit unter ihrer Führung alle Voraussetzungen für eine gute Doktorarbeit zu haben.

Außerdem gilt mein Dank **Dr. Carolin Delker** für ihre große Hilfe in statistischen Fragen, ihre Unkompliziertheit und die umfassenden Verbesserungsvorschläge für den schriftlichen Teil der Arbeit.

Des Weiteren danke ich für die Tatkraft, Erklärungen oder Ratschläge in diversen Methoden: **Dr. Sylvestre Marillonnet** für seine Hilfe und Bereitstellung des großartigen Golden-Gate-Klonierungssystems sowie all the „crazy“ talks about science; **Dr. Benedikt Athmer** für die bioinformatische Auswertung der RNASeq-Daten und die GO-Analysen; **Hagen Stellmach** für die Probenaufbereitungen für JA-Messungen sowie die Protoplasten-Transformationen; **Dr. Gerd Hause** für die Anfertigung der Semidünnschnitte diverser Staub- und Fruchtblattproben; **Dr. Susanne Dobritzsch** für die Vorarbeiten und die großartige Einführung in das Thema; **Dr. Tom Schreiber** für Klonierungshilfen sowie die Bereitstellung und Anleitung des *splitTALE*-Systems; **Dr. Kathleen Rothe** für die detaillierten Einführungen in das Golden-Gate-Klonierungssystem; **Nicole Bauer** für die Bereitstellung und Ratschläge zur Transformation der Hefe sowie **Dr. Ivan Acosta** für die Bereitstellung des *AtMYB21*-Promoters und die allgemeinen Diskussionen über das Wirken von MYB21. All diese Unterstützung hat mir Arbeit abgenommen und manche Experimente erst möglich gemacht.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Studentinnen Larissa Launhardt, Carolin Alfs und insbesondere **Lea von Sivers**, **Cornelia Gruber** und **Merve Kuru** für all ihr Engagement und ihren Beitrag zu qPCR-Analysen, Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten, Klonierungen sowie Tomaten- und Protoplasten-Transformationen.

Mein Dank gilt auch **Ulrike Huth** und **Yulong Li** für den reibungslosen Laboralltag und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Es war immer eine Freude für mich mit euch im Labor zu arbeiten. Dabei bin ich vor allem **Heena Yadav** von ganzem Herzen dankbar, dass sie während all der Zeit an meiner Seite war und wir Höhen und Tiefen miteinander teilen konnten. Ich danke ihr für ihre wissenschaftlichen und persönlichen Ratschläge und vor allem für ihre Freundschaft.

Außerdem danke ich **Dorothee Dreher** und **Stephan Grunewald** für alles, was ich von ihnen gelernt habe und ihre Freundschaft.

Nicht vergessen möchte ich Peter, Kathleen, Humberto, Clemens, Christine, Stephanie, Markus, Mandy, Tina, Jakob, Aldrin und Manuel, die mir ans Herz gewachsen sind und stark dazu beigetragen haben, dass ich mich im IPB immer sehr wohl gefühlt habe.

Mein besonderer Dank gilt meinen besten Freunden Steffi, Daniel und Uta für alles Wichtige neben der Doktorarbeit, ihre Unterstützung und Freundschaft von nah und fern. Ich bin sehr froh und dankbar mit euch befreundet zu sein.

Schließlich möchte ich mich von Herzen bei Papa für all seine Unterstützung und Ratschläge, auf die ich mich immer verlassen kann und bei Mutti für ihren Humor und ihre Fürsorglichkeit bedanken. Meinem Opa danke ich für seine Freude, Fürsorge und Ruhe für die wichtigen Dinge im Leben, die er immer ausgestrahlt hat. Ich hoffe sehr, du kannst noch „sehen“, dass ich endlich fertig geworden bin.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann für seine Liebe und dafür ein fester Teil meines Lebens geworden zu sein. Du bist die größte Errungenschaft meiner Doktorandenzeit.

Lebenslauf

Ramona Schubert

06110 Halle/Saale

E-Mail: ramona.schubert@ipb-halle.de

Ausbildung

- ab 06/2014** **Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale**
 Doktorarbeit
 (Betreuung: Prof. Dr. Bettina Hause)
- 10/2010 – 06/2013** **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Master of Science in Biology (Note 1,4)
 Masterarbeit: „Rolle von Oxylipinen in der Regulation der Mykorrhizierung nach Blattverwundung in *Solanum lycopersicum*“
 (Betreuung: Prof. Dr. Bettina Hause)
- 10/2007 – 09/2010** **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Bachelor of Science in Biology
 Bachelorarbeit: „Bodeneigenschaften von extensiv genutzten Grünländern in der Umgebung von Halle“
 (Betreuung: Dr. Harald Auge, UFZ Halle/Saale)
- 08/1998 – 06/2006** **Friedrich-Schiller-Gymnasium, Zeulenroda**
Abitur
 Hauptfächer: Biologie und Deutsch

Arbeitserfahrung

- 10/2013 – 03/2014** **Leonardo da Vinci-Stipendium im „Estacion Experimental del Zaidin“, Granada (Spanien)**
 (EU-Bildungsprogramm, 4600 € Förderung)
 Untersuchung des Effektes von Herbivorie auf systemische Abwehrprozesse innerhalb der Pflanze sowie auf die Mykorrhizierung
 (Betreuung: Dr. Maria J. Pozo)

06/2013 – 08/2013

Praktikum im Säugetierforschungsinstitut der polnischen Akademie der Naturwissenschaften, Bialowieza (Polen)

Untersuchung des Einflusses von Großherbivoren auf die Waldentwicklung

10/2011 – 01/2012

Praktikum im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale

Untersuchung des Effekts von Blattverwundung auf die Mykorrhizierung in Tomate

Ehrenamtliches Engagement im Ausland

03/2012 – 04/2012

Naturschutz-Kurs in Costa Rica

Arbeit mit Meeresschildkröten und Delfinen

03/2007 – 09/2007

Europäischer Freiwilligendienst in Polen

Arbeit in einer Integrationsschule (Englischunterricht)

10/2006 – 01/2007

Freiwilligendienst in Irland

Ökologisches Projekt (Farm)

Publikationen

Dobritzsch S, Weyhe M, Schubert R, Dindas J, Hause G, Kopka J, Hause B (2015) Dissection of jasmonate functions in tomato stamen development by transcriptome and metabolome analyses. BMC Biol 13:28. doi:10.1186/s12915-015-0135-3

Schubert R, Dobritzsch S, Gruber C, Hause G, Athmer B, Schreiber T, Marillonnet S, Okabe Y, Ezura H, Acosta IF, Tarkowska D, Hause B (2019) Tomato MYB21 Acts in Ovules to Mediate Jasmonate-regulated Fertility. Plant Cell 31 (5):1043-1062. doi:10.1105/tpc.18.00978

Schubert R, Grunewald S, von Sivers L, Hause B (2019) Effects of Jasmonate on Ethylene Function during the Development of Tomato Stamens. Plants (Basel, Switzerland) 8 (8). doi:10.3390/plants8080277

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades. Diese Arbeit wurde an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Begutachtung eingereicht.

Halle/ Saale, den 11.06.2019

Ramona Schubert