

**Charakterisierung *HAIRY MERISTEM*-ähnlicher Gene
und Identifizierung neuer Regulatoren der
Seitentriebentwicklung in *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

Vorgelegt von

Silke Schulze

aus Berlin

Köln 2007

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Theres
Prof. Dr. Wolfgang Werr

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2007

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	I
	Abkürzungsverzeichnis.....	V
1.	Einleitung.....	1
1.1	Meristeme sind die Wachstumspole der Pflanze.....	1
1.2	Organisation des Sprossapikalmeristems.....	1
1.3	Etablierung und Erhalt des SAM.....	2
1.4	Regulation der Stammzellpopulation.....	4
1.5	Etablierung der sekundären Wachstumsachsen durch Lateralmeristeme	5
1.6	Funktion der GRAS-Gene bei der Zelldifferenzierung.....	8
1.7	Zielsetzung.....	9
2.	Material und Methoden.....	10
2.1	Materialien.....	10
2.1.1	Chemikalien.....	10
2.1.2	Enzyme.....	10
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	10
2.1.4	Antikörper.....	10
2.1.5	Organismen.....	11
2.1.5.1	Bakterien.....	11
2.1.5.2	Pflanzen.....	11
2.1.6	Vektoren.....	12
2.1.7	Plasmide.....	12
2.1.8	Oligonukleotide.....	12
2.1.9	Puffer und Kulturmedien.....	16
2.1.10	Computerprogramme und Datenbanken.....	16
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Genetische Kartierung.....	17
2.2.2	Isolierung von genomischer DNA.....	17
2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	17
2.2.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	17
2.2.5	Isolierung von RNA aus Pflanzen.....	18

2.2.6	cDNA-Synthese / RT-PCR.....	18
2.2.7	Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	18
2.2.8	Sequenzierung.....	19
2.2.9	Inkubationsbedingungen für Bakterien.....	19
2.2.10	Wachstumsbedingungen für Pflanzen.....	19
2.2.11	Transformation von Bakterien.....	19
2.2.12	RNA <i>In Situ</i> Hybridisierung.....	19
2.2.12.1	Herstellen der RNA-ISH-Sonden.....	19
2.2.12.2	Sequenzbereiche der verwendeten RNA-ISH-Sonden.....	20
2.2.12.3	Vorbereitung und Durchführung der RNA-ISH.....	20
2.2.13	Kreuzungen von Pflanzen.....	20
2.2.14	Phänotypische Charakterisierung der Pflanzen.....	21
2.2.15	Elektronenmikroskopie.....	21
3.	Ergebnisse.....	22
3.1	Kartierung des <i>eo15</i> -Locus.....	22
3.1.1	Vorarbeiten zu <i>eo15</i>	22
3.1.2	Phänotyp der <i>eo15</i> -Linie.....	23
3.1.3	PCR basierte Marker für die Kartierung des <i>eo15</i> -Locus.....	23
3.1.4	Kartierung des <i>eo15</i> -Locus in einer F2-Kartierungspopulation.....	24
3.1.5	Etablierung neuer Populationen zur Kartierung des <i>eo15</i> -Locus.....	28
3.2	Einfluss von <i>HAIRY MERISTEM</i> -ähnlichen Genen aus <i>A. thaliana</i> auf die Sprossarchitektur und den Erhalt von Meristemen.....	30
3.2.1	Analyse des Verzweigungsmusters von <i>35S::miR171</i> -Pflanzen.....	30
3.2.2	Identifizierung von <i>scl</i> -Insertionslinien durch <i>in silico</i> -Analyse.....	32
3.3.	Untersuchungen zur Anlage von Seitentrieben in den <i>scl</i> -Insertionslinien bei Kultivierung in kurzer und langer Photoperiode.....	34
3.3.1	Analyse der Einzel- und Doppelmutanten.....	34
3.3.2	Analyse der <i>scl6-1</i> und <i>scl22-1</i> -Insertionslinie.....	35
3.3.3	Analyse der <i>scl27-1</i> -Insertionslinie.....	35
3.4	Untersuchungen von Doppel- und Tripelmutanten bei Kultivierung in kurzer und langer Photoperiode.....	37
3.4.1	Analyse der <i>scl6-1 scl22-1</i> -Doppelmutante bei Kultivierung in kurzer und langer Photoperiode.....	38
3.4.2	Analyse der <i>scl6-1 scl27-1</i> -Doppelmutante bei Kultivierung in kurzer und langer Photoperiode.....	38

3.4.3	Phänotypische Charakterisierung der Doppelmutante <i>scl22-1 scl27-1</i> bei Kultivierung in langen Photoperioden.....	40
3.4.4	Analyse der <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> -Tripelmutante bei Kultivierung in langen Photoperioden.....	43
3.4.5	Analyse der <i>scl22-1 scl27-1</i> und <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> -Pflanzen bei Kultivierung in kurzen Photoperioden.....	44
3.4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der Einzel- und Doppelmutanten und der Tripelmutante.....	46
3.5.	Untersuchungen zur Termination des Hauptmeristems.....	47
3.5.1	Untersuchungen zum Einfluss der Länge der Photoperiode auf den Erhalt des Hauptmeristems in der <i>scl22-1 scl27-1</i> -Doppelmutante und der Tripelmutante.....	47
3.5.2	Analyse der <i>35S::miR171 constans</i> -Pflanzen.....	51
3.6	Analyse der Doppelmutanten von <i>las-4</i> mit <i>scl6-1</i> , <i>scl22-1</i> oder <i>scl27-1</i>	54
3.6.1	Charakterisierung der <i>scl6-1 las-4</i> -Doppelmutante.....	54
3.6.2	Charakterisierung der <i>scl22-1 las-4</i> -Doppelmutante.....	55
3.6.3	Analyse der <i>scl27-1 las-4</i> -Doppelmutante.....	55
3.7	RNA <i>in situ</i> Hybridisierungen zur Analyse der gewebespezifischen Expression von <i>SCL6</i> , <i>SCL22</i> und <i>SCL27</i> im Wildtyp und von <i>LAS</i> , <i>STM</i> und <i>WUS</i> in Apices der <i>scl22-1 scl27-1</i> -Doppelmutante und der Tripelmutante.....	57
3.7.1	Analyse der gewebespezifischen Expression von <i>SCL27</i> in Wildtyp-Apices während der vegetativen und reproduktiven Phase.....	57
3.7.2	Untersuchung der Transkriptakkumulation von <i>SCL22</i> in Wildtyp-Apices	60
3.7.3	Analyse der gewebespezifischen <i>SCL6</i> -Expression in Wildtyp-Sprossspitzen.....	62
3.7.4	Expressionsstudien für <i>STM</i> und <i>LAS</i> in Apices von <i>scl22-1 scl27-1</i> und <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> -Pflanzen.....	63
3.8	Untersuchungen zu Veränderungen im Apikalmeristem von <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> -Pflanzen bei Kultivierung in kurzen Photoperioden.....	66
3.8.1	Analyse der Morphologie von <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> -Meristemen.....	66
3.8.2	Untersuchungen zur Dynamik der ektopischen Meristeme im Spross von <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> -Pflanzen.....	70
3.8.3	Studien zur Expression von <i>STM</i> und <i>WUS</i> in vegetativen Sprossspitzen der Tripelmutante.....	71
3.8.3.1	Analyse der gewebespezifischen <i>STM</i> -Expression in vegetativen Meristemen der <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> -Pflanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	72

3.8.3.2	Untersuchung der <i>WUS</i> -Expressionsdomäne in vegetativen Meristemen der <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> -Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten.....	75
3.9	Analysen zur Organisation der Meristemdome in <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> -Tripelmutanten.....	78
4.	Diskussion.....	83
4.1	<i>eo15</i> verstärkt den <i>las-4</i> Verzweigungsdefekt und ist mit Chromosom 2 gekoppelt.....	83
4.2	Funktion der <i>HAM</i> -ähnlichen Gene bei der Anlage von Seitentrieben und beim Erhalt des Apikalmeristems in <i>A. thaliana</i>	85
4.2.1	Phänotypische Analysen von Insertionsmutanten zeigen den Einfluss von <i>SCL6</i> , <i>SCL22</i> und <i>SCL27</i> auf die Entwicklung von Seitentrieben.....	85
4.2.2	<i>SCL</i> Gene regulieren den Erhalt des Apikalmeristems unter Kurztagbedingungen.....	88
4.2.3	Transkripte der <i>HAM</i> -ähnlichen Gene von <i>A. thaliana</i> akkumulieren im Apikalmeristem und in den Lateralmeristemen.....	90
4.2.4	Die Expressionsmuster von <i>miR171a</i> und den Zielgenen <i>SCL6</i> , <i>SCL22</i> und <i>SCL27</i> zeigen nur wenige Überschneidungen.....	93
4.2.5	In den Achseln der <i>scl22-1 scl27-1</i> und <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> Mutanten werden Meristeme angelegt.....	94
4.2.6	Morphologische Veränderungen des Apikalmeristems in den <i>scl22-1 scl27-1</i> und <i>scl6-1 scl22-1 scl27-1</i> Mutanten.....	96
4.2.7	In Meristemen terminierter Apices ist die meristematische Identität erhalten und die Differenzierung der Primordien unterdrückt.....	98
4.2.8	Die Aktivität von <i>SCL22</i> und <i>SCL27</i> beeinflusst den Erhalt der Grenzen von Apikal- und Lateralmeristem.....	100
5.	Zusammenfassung.....	103
6.	Abstract.....	105
7.	Literatur.....	107
8.	Erklärung.....	117
9.	Lebenslauf.....	118
	Danksagung.....	120

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
<i>AGO1</i>	<i>Argonaut11</i>
<i>AS1</i>	<i>ASYMMETRIC LEAVES 1</i>
<i>AXR1</i>	<i>AUXIN RESISTANT1</i>
<i>BA1</i>	<i>BARREN STALK1</i>
bp	Basenpaar
<i>Bl</i>	<i>Blind</i>
<i>BRC1</i>	<i>BRANCHED1</i>
CAPS	cleaved-amplified-polymorphic-sequence
<i>CNA</i>	<i>CORONA</i>
<i>CLV</i>	<i>CLAVATA</i>
Col-0	Columbia
<i>CO</i>	<i>CONSTANS</i>
<i>CUC</i>	<i>CUPSHAPED COTYLEDON</i>
CZ	zentrale Zone ("central zone")
<i>DAD</i>	<i>DECREASED APICAL DOMINANCE</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>DRN</i>	<i>DORNRÖSCHEN</i>
<i>eol</i>	<i>enhancer of las-4</i>
FM	Blütenmeristem (floral meristem)
GA	Gibberellinsäure
<i>GAI</i>	<i>GIBBERELIC ACID INSENSITIVE</i>
<i>HAM</i>	<i>HAIRY MERISTEM</i>
<i>HAN</i>	<i>HANABU TARANU</i>
Kap	Kapitel
kb	Kilobasen
<i>KNAT</i>	<i>KNOX</i> -Gene aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>KNOX</i>	Knotted1-ähnliche Homeobox-Gene
<i>LAS</i>	<i>LATERAL SUPPRESSOR</i> aus <i>Arabidopsis</i>
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
LM	Lateralmeristem
LRR	Leucin-reiche-Wiederholungen ("leucin-rich-repeats")
Ls	Lateral suppressor aus Tomate
<i>MAX</i>	<i>MORE AXILLARY GROWTH</i>
<i>miR</i>	<i>microRNA</i>
<i>MOC1</i>	<i>MONOCULM1</i>

mRNA	Boten-RNA
OC	organising center
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>PHB</i>	<i>PHABULOSA</i>
<i>PHV</i>	<i>PHAVOLUTA</i>
<i>PNH</i>	<i>PINHEAD</i>
PZ	periphere Zone
QC	ruhendes Zentrum (quiescent center)
QTL	Quantitative trait loci
RAM	root apical meristem
<i>REV</i>	<i>REVOLUTA</i>
<i>RGA</i>	<i>REPRESSOR OF GA1-3</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-ISH	RNA In-Situ-Hybridisierung
RT	Raumtemperatur
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RM	Rippenmeristem
<i>RMS</i>	<i>RAMOSUS</i>
SAM	Sprossapikalmeristem
<i>SCL</i>	<i>Scarecrow like</i>
<i>SCR</i>	<i>SCARECROW</i>
<i>SHR</i>	<i>SHORTROOT</i>
<i>SPS</i>	<i>SUPERSHOOT</i>
<i>STM</i>	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
SSLP	simple-sequence-length-polymorphisms
<i>TB1</i>	<i>Teosinte branched</i>
T-DNA	Transfer-DNA
<i>ULT1</i>	<i>ULTRAPETALA1</i>
<i>WUS</i>	<i>WUSCHEL</i>
WS	Wassilewskija

Die verwendeten Maßeinheiten richten sich nach dem System für internationale Maßeinheiten und die chemischen Elemente werden mit den gängigen Abkürzungen bezeichnet.

1. Einleitung

1.1 Meristeme sind die Wachstumspole der Pflanze

Die Entwicklung der Pflanzen wird in zwei Phasen eingeteilt, die Embryogenese und die postembryonale Phase. Während der embryonalen Phase werden der radiale Gewebeaufbau, die apikal-basal ausgerichtete Wachstumsachse und die primären Meristeme, die aus kleinen, undifferenzierten Zellen bestehen, angelegt. Die primären Meristeme, das Sprossapikalmeristem (SAM) und das Wurzelapikalmeristem (RAM), liegen an den entgegengesetzten Polen der Pflanze. Während der postembryonalen Phase führen das SAM und RAM die apikal-basale Wachstumsachse fort, indem das RAM die primäre Wurzel bildet und das Sprossapikalmeristem den primären Spross. Anders als im RAM, werden im SAM Primordien angelegt, die zu Blättern auswachsen.

Der Spross einer Pflanze besteht aus Modulen, die als Phytomere bezeichnet werden. Ein einzelnes Phytomer setzt sich aus einem Internodium, einem dazugehörigen Blatt und einer in der Blattachsel liegende Seitentriebknospe, die aus einem sekundären Meristem hervorgeht, zusammen (Lyndon, 1990). Sekundäre Meristeme werden als Lateralmeristeme (LM) bezeichnet und üben durch Initiation der sekundären Wachstumsachsen einen entscheidenden Einfluss auf den Habitus der Pflanzen aus. Vergleichbar zum SAM legt das LM Primordien an und bildet so die Seitentriebknospe. Das Auswachsen einer Knospe zu einem lateralen Spross, der das Entwicklungsprogramm des primären Triebes wiederholt, unterliegt einerseits den Einflüssen durch die Umwelt und ist andererseits abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze. Auf diese Weise können Pflanzen ihr Wachstumsprogramm an wechselnde Bedingungen anpassen. Beim Übergang zur reproduktiven Phase ändert sich die Identität des LM zu einem Blütenmeristem (FM), welches statt eines Seitentriebs Blüten initiiert.

1.2 Organisation des Sprossapikalmeristems

Das SAM von Angiospermen wird durch das Tunica-Corpus Konzept und die zytologische Zonierung strukturell unterteilt. Die ersten zwei Zellschichten, L1 und L2 der Tunica, zeichnen sich durch eine antiklinale Zellteilung aus. In der L2-Schicht sind die ersten Zellteilungen antiklinal, sobald aber laterale Organe gebildet werden, ist die Zellteilungsebene auch periklinal. Unterhalb der Tunica liegen Zellen der L3-Schicht, die den Corpus bilden und sich periklinal teilen (Vaughan, 1952; Steeves und Sussex, 1989). Durch Studien an Chimären konnte gezeigt werden, dass die Klone der drei

Zellschichten unterschiedliche Bestimmungen haben (Satina *et al.*, 1940). Die Zellen der L1-Schicht differenzieren sich zu Epidermiszellen. Die L2-Schicht führt zu subepidermalen Zellen und den Gameten. Klone der L3-Schicht bilden das vaskuläre System und das Grundgewebe (Satina *et al.*, 1941; Stewart und Dermen, 1970).

Die zytologische Einteilung des Meristems ist der Tunica-Corpus-Organisation überlagert. Im Zentrum des Meristems finden sich größere Zellen der zentralen Zone (CZ), die eine geringere Teilungsrate aufweisen als die kleineren Zellen der peripheren Zone (PZ). Die PZ umschließt die CZ und ist der Bereich, in dem die ersten Zellteilungen stattfinden, die zur Bildung der Blattanlagen führen. Die Gewebe des primären Triebes gehen aus Zellteilungen des Rippenmeristems (RM) hervor, welches unterhalb der zentralen Zone liegt (Vaughan, 1952; Steeves und Sussex, 1989).

1.3 Etablierung und Erhalt des SAM

Die Funktion der *knotted1-like homeobox* (*KNOX*)-Gene bei der Etablierung und Erhaltung der meristematischen Identität wurde an Verlust- und „gain-of function“-Mutanten aufgedeckt. Die dominante *knotted1-D* (*kn1-D*)-Mutante in *Zea mays* (*Z. mays*) weist ektopische Meristeme auf der adaxialen Seite oberhalb der Blattespreiten auf (Smith *et al.*, 1992). Eine Verlustmutante dagegen zeigte, dass *ZmKN1* eine Funktion im Erhalt der Meristeme hat (Kerstetter *et al.*, 1997). *KNOX*-Gene werden in zwei Klassen eingeteilt, *KNOX1*, zu der *ZmKN1* gehört, und *KNOX2*, die zwischen Mono- und Dikotyledonen konserviert sind (Kerstetter *et al.*, 1994; Bharathan *et al.*, 1999). In *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) zählen vier Gene zur Klasse-1 der *KNOX1*-Gene: *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*), *Knotted* in *Arabidopsis thaliana*/*BREVIPEDICELLUS* (*KNAT1/BP*), *KNAT2* und *KNAT6*.

Barton und Poethig (1993) konnten anhand eines starken *stm-1*-Allels eine Funktion von *STM* bei der Anlage des embryonalen SAM aufdecken. *stm-1*-Mutanten legen während der Embryogenese kein SAM an und Keimlinge bilden keine Blätter. Während der Embryogenese kann eine Expression von *STM* in Wildtyp Pflanzen zwischen den Keimblättern detektiert werden (Long und Barton, 1998). Obwohl *KNAT1*, *KNAT2* und *KNAT6* ebenfalls im Meristem exprimiert sind und eine Überexpression von *KNAT1* und *KNAT2* zur Bildung ektopischer Meristeme führt (Chuck *et al.*, 1996), wirkt sich eine Verlustmutation der Gene nicht auf die Entwicklung oder die Funktion des SAM aus (Byrne *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2002, Venglat *et al.*, 2002; Dean *et al.*, 2004).

Eine Doppelmutante mit Verlustallelen von *ASYMETRIC LEAVES1 (AS1)* und *STM*, *as1/stm*, zeigte allerdings, dass der Erhalt des Meristems durch eine funktionelle Redundanz zwischen *KNAT1* und *STM* reguliert wird (Byrne *et al.*, 2002). Obwohl *STM* in *as1/stm*-Pflanzen nicht exprimiert wird, entwickelte sich ein SAM. Anhand dieser Daten wurde eine negative Regulation der *KNAT1*-Expression in Blattprimordien durch *AS1* deutlich, da *KNAT1* im Meristem der *as1/stm*-Pflanzen ektopisch exprimiert ist (Byrne *et al.*, 2002). Zudem ist in Blattprimordien der *as1*-Mutante *KNAT1* und *KNAT2*, nicht aber *STM* ektopisch exprimiert (Byrne *et al.*, 2000; Ori *et al.*, 2000). Eine ektopische Expression von *AS1* in *stm*-Mutanten lässt auf eine Regulation der *AS1*-Expression im Meristem durch *STM* schließen. Im Wildtyp-Meristem ist *AS1* komplementär zu *STM* exprimiert (Byrne *et al.*, 2000). Die Funktion von *STM* auf den Erhalt der meristematischen Identität scheint darin zu bestehen, die Expression von Primordium-spezifisch exprimierten Genen (z.B. *AS1*) zu inhibieren (Byrne *et al.*, 2002).

Die Grenze zwischen dem Meristem und sich entwickelnden Primordien wird zusätzlich durch eine strikte Kontrolle der Gibberellinsäure (GA)-Akkumulation reguliert. Neben *STM* regulieren auch weitere *KNOX1*-Proteine die Differenzierung der meristematischen Zellen durch Inhibierung der Expression des *GA20-OXIDASE*-Gens im Meristem (Hay *et al.*, 2002). Die *GA20-OXIDASE* katalysiert einen der letzten Schritte zum aktiven GA. Sakamoto *et al.* (2001) zeigten, dass die *KNOX1*-Bindestelle im Promotor des *GA20-OXIDASE*-Gens in Tabak essentiell für eine Regulation der Transkription durch das *KNOX1*-Gen *NTH15* ist. Zusätzlich führte eine konstitutive Aktivierung der GA-Antwort, verursacht durch eine Mutation in *SPINDLY (SPY)*, zu einer Verstärkung des schwachen *stm-2*-Allels (Hay *et al.*, 2002).

Neben den *KNOX1*-Genen üben auch Mitglieder der Familie der NAC-Domänen-Proteine, *CUP-SHAPED COTYLEDON1* und 2 (*CUC1* und *CUC2*), eine Funktion bei der Etablierung des SAM aus. Eine Doppelmutante von *cuc1* und *cuc2* bildet kein SAM und durch Fusion der Keimblätter bildet sich eine becherförmige Struktur (Takada *et al.*, 2001). Die *CUC1* und *CUC2*-Gene werden im Embryo zwischen den zwei Kotyledonen exprimiert und markieren das zukünftige SAM (Aida *et al.*, 1997;). Eine Überexpression von *CUC1* führt zur Bildung ektopischer Meristeme auf der adaxialen Seite der Keimblätter (Takada *et al.*, 2001). In *stm*-Pflanzen sind *CUC1* und *CUC2* exprimiert, eine Expression von *STM* ist in einer *cuc1 cuc2*-Doppelmutante aber nicht nachweisbar und lässt auf eine Regulation der *STM*-Expression durch *CUC1* und *CUC2* schließen. Die Transkripte der *CUC1* und *CUC2*-Gene selbst unterliegen der Regulation durch die microRNA *miR164* (Laufs *et al.*, 2004).

1.4 Regulation der Stammzellpopulation

Um ein unbegrenztes Wachstum und gleichzeitig die Fähigkeit, laterale Organe anzulegen, aufrechtzuerhalten, muss die Größe der Stammzellpopulation reguliert werden. Die Stammzellidentität in der CZ des SAM und FM wird durch den Homeodomänen Transkriptionsfaktor WUSCHEL (WUS) gewährleistet. *WUS* ist im Meristem in Zellen der L3-Schicht, im sogenannten „organising center“ (OC; Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998) exprimiert. Der Verlust der *WUS*-Funktion führt zu einer vorzeitigen Termination des SAM. Die Stammzellen in der CZ, die bereits während der Embryogenese gebildet wurden, formen nur einige Blätter. Dies deutet darauf hin, dass *WUS* zur Aufrechterhaltung des Meristems notwendig ist. Durch Adventivmeristeme wird das Wachstum in *wus*-Pflanzen weitergeführt, bis auch die sekundären Triebe terminieren und das charakteristische „stop and go“-Wachstum in tertiären Trieben fortgesetzt wird. In *wus*-Mutanten ist die Stammzellpopulation verkleinert und wird durch die Bildung von Primordien aufgebraucht (Laux *et al.*, 1996).

Die Expression von *WUS* im Meristem wird stark reguliert, da eine ektopische Expression von *WUS* ausreichend ist, um eine „ektopische“ Stammzellidentität zu initiieren. Arbeiten von Brand *et al.* (2000) und Schoof *et al.* (2000) zeigten, dass die Expression von *WUS* im Meristem durch die *CLAVATA* (*CLV*)-Signalkaskade reguliert wird. Zu dieser Signalkaskade werden die Gene *CLV1*, *CLV2* und *CLV3* gezählt (Leyser und Furner, 1992; Clark *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1997; Kayes und Clark, 1998). *CLV1* kodiert für eine Rezeptor-ähnliche Kinase, deren Expressionsdomäne in der L3-Schicht des Meristems mit der von *WUS* überlappt. Die extrazelluläre Domäne des Proteins besteht aus Leucin-reichen Wiederholungen (LRR) und die intrazelluläre Domäne enthält die konservierten Kinasemotive (Clark *et al.*, 1997; Mayer *et al.*, 1998).

clv1-Pflanzen sind durch ein vergrößertes Meristem gekennzeichnet, welches auf eine erhöhte Anzahl an Stammzellen zurückgeführt wird (Clark *et al.*, 1993). Aufgrund der Größe der Stammzellpopulation ist auch die Organbildung in der PZ verändert und *clv1*-Mutanten sind durch eine erhöhte Anzahl von Blütenorganen charakterisiert. Die *WUS*-Expressionsdomäne in *clv1* ist vergrößert und die Analyse einer *wus/clv1*-Doppelmutante zeigte, dass *WUS* und *CLV1* im selben Signalweg wirken (Laux *et al.*, 1996). *CLV3* ist in der CZ des Meristems von der L1- bis zur L3-Schicht exprimiert und kodiert für ein sekretiertes Protein. *clv1* und *clv3*-Mutanten unterscheiden sich nicht voneinander, was auf einen gemeinsamen Signalweg schließen lässt (Clark *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1997; Fletcher *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu *clv1* und *clv3*-Mutanten hat eine *clv2*-Mutation eine schwächere Wirkung auf die Funktion des SAM und FM (Kayes and Clark, 1998). CLV2 kodiert für ein Rezeptor-ähnliches Protein, das eine extrazelluläre LRR besitzt, aber im Gegensatz zu CLV1 keine intrazelluläre Kinasedomäne aufweist. Es wird vermutet, dass CLV1 und CLV2 einen Rezeptorkomplex bilden und CLV3 als Ligand mit der extrazellulären Domäne von CLV1 interagiert (Rojo *et al.*, 2002; Lenhard *et al.*, 2003). Eine nicht funktionierende *CLAVATA*-Signalkaskade, wie für die *clv1* oder *clv3*-Mutante beschrieben, führt zu einem Verlust der Regulation der *WUS*-Expression und damit zu einer Vergrößerung der Stammzellpopulation (Brand *et al.*, 2000). Während *WUS* die Bildung von Stammzellen durch eine positive Stimulierung der *CLV3*-Expression fördert, kontrolliert die *CLAVATA*-Signalkaskade über CLV1 und CLV3 die Stammzellpopulation durch Reprimierung der *WUS*-Expression im OC (Brand *et al.*, 2000).

Neben der *CLAVATA*-Signalkaskade wird die *WUS*-Expression auch über weitere Regulatoren der Transkription, *ULTRAPETALA1 (ULT1)* und *HANABU TARANU (HAN)*, kontrolliert. Mutationen in *ULT1* führen zu einer Vergrößerung des Infloreszenz- und Blütenmeristems und zu einer Ausweitung der *WUS*-Expressionsdomäne, was darauf hindeutet, dass *ULT1* die Akkumulation von Stammzellen negativ reguliert (Carles *et al.*, 2004). Eine Mutation des *HAN*-Gens führt bereits während der Embryogenese zu einer Ausweitung der *WUS*-Expressionsdomäne. *HAN* wird an der Grenze des Meristems exprimiert und scheint die Zahl der *WUS* exprimierenden Zellen zu beeinflussen (Zhao *et al.*, 2004).

1.5 Etablierung der sekundären Wachstumsachsen durch Lateralmeristeme

Die Anlage sekundärer Triebe erfolgt erst während der postembryonalen Wachstumsphase der Pflanze. Die Seitentriebe entwickeln sich aus Lateralmeristemen, die in den Achseln der Blätter angelegt wurden. Die Bildung von Lateralmeristemen in *A. thaliana* wird in zwei Phasen unterteilt (Hempel und Feldman, 1994; Grbic und Bleecker, 1996). Während der vegetativen Entwicklungsphase erfolgt die Initiierung und Ausbildung von lateralen Meristemen in einiger Distanz vom SAM und zeigt einen akropetalen Gradienten. In der reproduktiven Phase der Entwicklung ändert sich dieses Muster und LM entstehen in größerer Nähe zum SAM. Die Entwicklung von Seitentrieben folgt nun einem basipetalen Gradienten (Hempel und Feldmann, 1994; Grbic und Bleecker, 1996).

Lateralmeristeme entwickeln sich in der Regel an der adaxialen Seite. Ein dominantes Allel des *PHABULOSA (PHB)*-Locus, *phb-1d*, führte zu einer vollständigen Adaxialisierung

ung der Blätter und LM wurden auch auf der abaxialen Seite des Blattes gefunden (McConnell and Barton, 1998). Weitere Hinweise, dass die adaxiale Seite die Entstehung von LM beeinflusst, fanden sich in Expressionsstudien mit *KNAT1* und *CUC1* in *A. thaliana* und *KN1* in *Z. maize*. Eine ektopische Expression dieser Gene führte zur Bildung von Adventivknospen auf der adaxialen Seite der Blätter (Vollbrecht *et al.*, 1991; Takada *et al.*, 2001;). Gleichzeitig zeigten diese Experimente, dass sich ektopische Meristeme oberhalb der Leitbündel bildeten und diese vermutlich eine positive Wirkung auf die Bildung von Meristemen ausübten (Chuck *et al.*, 1996; Takada *et al.*, 2001).

Zur Entstehung der LM werden zwei Modelle diskutiert. Steeves und Sussex (1989) favorisieren die Idee des „*detached meristem*“. In diesem Konzept wird davon ausgegangen, dass während der Entwicklung der Primordien meristematische Zellen vom SAM getrennt werden, diese aber weiterhin ihren undifferenzierten Status behalten und später die LM initiieren. Die These der „*de novo*“ Initiierung von LM geht davon aus, dass ausdifferenzierte Zellen einen undifferenzierten, meristematischen Status zurückerlangen und anschließend als pluripotente Zellen LM initiieren (Napoli *et al.*, 1999; Shimizu-Sato und Mori, 2001).

Das Modell der „*detached meristem*“-Hypothese wird durch die Expressionsanalyse des Meristemmarkers *STM* unterstützt. Zwei Studien (Grbic und Bleecker, 2000; Long und Barton, 2000) zeigten, dass *STM* kontinuierlich in dem Bereich der interprimordialen Region exprimiert wird. Es konnte bisher allerdings nicht eindeutig bewiesen werden, dass die Lateralmeristeme von den Zellen der interprimordialen Region, die *STM* exprimierten, gebildet wurden. Studien zur Expression des *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)*-Gens unterstützten das Modell der „*detached meristem*“-Bildung (Greb *et al.*, 2003). *LAS*-Transkripte akkumulierten in der interprimordialen Region aller vom SAM angelegten Blattprimordien und zeigten eine Überschneidung mit der *STM*-Expressionsdomäne in den Achseln. Eine *LAS*-Expression ist ab dem P1- bis zum P20/21-Primordium detektierbar und wird schwächer, sobald sich die *STM*-Expressionsdomäne auf den zentralen Bereich der Blattachsel fokussiert (Greb *et al.*, 2003). *LAS* dient somit als molekularer Marker der meristematischen Identität von Zellen, aus denen Lateralmeristeme entstehen.

Eine Mutation im *LAS*-Gen führt zu einem Defekt bei der Anlage von Achselmeristemen während der vegetativen Phase. *LAS* erhält die meristematische Kompetenz der interprimordialen Zellen aufrecht und wirkt einer Differenzierung der Achselzellen entgegen (Greb *et al.*, 2003). Das *LATERAL SUPPRESSOR (LS)*-Gen wurde erstmals aus Tomate isoliert (Schumacher *et al.*, 1999) und als ein Mitglied der GRAS-Genfamilie

klassifiziert (Pysh *et al.*, 1999). Der Phänotyp der *ls*-Mutante in Tomate ist ebenfalls durch eine Reduktion der Seitentriebbildung während der vegetativen Phase charakterisiert. Die Funktion von LATERAL SUPPRESSOR ist innerhalb von Monokotyledonen und Dikotyledonen konserviert. Li *et al.* (2003) isolierten *MONOCULM1* (*MOC1*), ein zu *LAS* orthologes Gen aus Reis. In der *moc1*-Verlustmutante ist die Anlage von vegetativen Trieben unterdrückt.

Neben der *las* Mutante wurden weitere Mutanten identifiziert, bei denen die Initiation der Lateralmeristeme gestört ist. In der *revoluta* (*rev*)-Mutante wird die Bildung von Achselmeristemen in allen Blattachsen unterdrückt und die Organisation der Leitbündel ist gestört. Das Gen *REVOLUTA* gehört zur Klasse III der HD-ZIP-Genfamilie von Transkriptionsfaktoren und wird in den Achseln der Blattprimordien und im vaskulären System exprimiert (Talbert *et al.*, 1995). Die Gene *PINHEAD* (*PNH*) und *Argonaute1* (*AGO1*) kodieren für Proteine der PAZ/PIWI-Proteinfamilie. In *pnh* und *ago1*-Mutanten wird die adaxiale Identität nicht korrekt ausgebildet und die Anlage aller Meristeme ist dadurch gestört (Lynn *et al.*, 1999; Kidner und Martienssen, 2004). Beim BLIND (*BI*)-Protein handelt es sich um einen R₂R₃ MYB Transkriptionsfaktor. Eine Mutation in *BI* führt in Tomate zu einem Defekt in der Anlage von Lateralmeristemen in der vegetativen und reproduktiven Phase (Schmitz *et al.*, 2002). In *A. thaliana* kontrollieren die zu *BI*-homologen-Gene *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEM* (*RAX*) die Anlage von Lateralmeristemen. Die Aktivität der *RAX*-Gene führt zu einer Feinregulierung der Lateralmeristembildung entlang der Sprossachse (Müller, 2005).

Mitglieder der *bHLH*-Genfamilie haben ebenfalls eine positive Wirkung auf die Anlage von Lateralmeristemen. Die *lax-panicle* (*lax*)-Mutante in Reis ist durch eine Reduktion der Seitentriebanlage in der vegetativen und reproduktiven Phase charakterisiert (Komatsu *et al.*, 2003). Eine Mutation im orthologen Gen *BARREN STALK1* aus *Z. mays* (*BA1*) führt ebenfalls zur einer Unterdrückung der Anlage aller Achselmeristeme (Gallavotti *et al.*, 2004). Eine Funktion der *CUC*-Gene bei der Anlage von Seitentrieben wurde von Hibara *et al.* (2006) beschrieben.

Neben Mutationen, die zur Unterdrückung der Seitentriebanlagen führen, sind auch Mutationen bekannt, die förderlich auf die Bildung und das Auswachsen von Seitentrieben wirken. Die *more axillary growth* (*max*)-Mutanten in *A. thaliana*, die *ramosus* (*rms*)-Mutanten in *Pisum sativum* und die *decreased apical dominance* (*dad*)-Mutanten in Petunie sind durch ein verstärktes Auswachsen der Seitentriebknospen charakterisiert (Lincoln *et al.*, 1990; Beveridge *et al.*, 1996; Napoli *et al.*, 1996; Stirnberg *et al.*, 2002). Die Genprodukte wirken in einem neuen regulatorischen Signalweg, in dem Carotenoide als sekundäre Signalmoleküle die Wirkung von Auxin

auf das Auswachsen von Seitentriebknospen übermitteln. Der Verzweigungsdefekt liegt an einem verstärkten Auxintransport, der durch eine Überexpression von Mitgliedern der Auxintransporter-Familien PIN und AUX1 hervorgerufen wird (Bennett *et al.*, 2006; Lazar und Goodman, 2006). Eine Mutation in dem Gen *AUXIN RESISTANT1 (AXR1)* führt zu einem ähnlichen Defekt. Darüber hinaus wurde für die *axr1-12*-Mutante eine Anlage akzessorischer Seitentriebe beschrieben (Stirnberg *et al.*, 1999).

Weitere Mutanten mit veränderter Sprossarchitektur sind *supershoot/bushy (sps/bus)*, *branched1 (brc1)* und *teosinte branched1 (tb1)* von *A. thaliana* und *Z. maize*. Die *sps* Mutante ist durch eine gesteigerte Anzahl von Seitentriebknospen pro Achsel charakterisiert und weist erhöhte Cytokiningehalte auf (Reintanz *et al.*, 2001; Tantikanjana *et al.*, 2001). *TB1* und *BRC1* kodieren für TCP-Transkriptionsfaktoren. Eine Mutation in *TB1* von *Z. maize* oder im orthologen Gen *BRC1* von *A. thaliana* führt zu einem verstärkten Auswachsen der Seitentriebknospen (Doebley *et al.*, 1997; Aguilar-Martínez *et al.*, 2007). Eine Überexpression von *TB1* in *Z. maize* oder Reis resultiert in einer Unterdrückung des Auswachsens von Seitentriebknospen (Doebley *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 2003).

1.6 Funktion der GRAS-Gene bei der Zelldifferenzierung

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass ein Großteil der charakterisierten Mitglieder der GRAS-Genfamilie die Differenzierung von Geweben fördern oder verhindern. Der Name dieser Familie wurde von den drei ersten charakterisierten Mitgliedern, GIBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI); REPRESSOR OF gai-3 (RGA) und SCARECROW (SCR), abgeleitet (Pysh *et al.*, 1999). Die Proteine GAI und RGA konnten der Untergruppe der „DELLA-Domänen“ Proteine zugeordnet werden. DELLA-Proteine sind Regulatoren des Wachstums und werden durch eine GA-vermittelte Signalkaskade abgebaut (Fleet und Sun, 2005). Eine Mutation in den beiden entsprechenden Genen führt in den Verlustmutanten zu einer konstitutiven GA-Antwort (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1997; Silverstone *et al.*, 1998, Itoh *et al.*, 2002).

Zwei weitere Mitglieder der GRAS Familie, SHORTROOT (SHR) und SCR, haben Funktionen bei der Etablierung der radiären Musterbildung der Wurzel (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000). *SHR* wird in der Stele exprimiert, das SHR-Protein liegt aber auch in den angrenzenden Schichten und im ruhenden Zentrum (quiescent center, QC) vor und wirkt nicht zellautonom aktivierend auf die Expression des *SCR*-Gens. Das SCR-Protein wiederum fördert die asymmetrische Zellteilungen der cortical-

endodermalen-Initialzellen. Durch diese Art der Zellteilungen werden die Endodermis und der Cortex der Wurzel etabliert (Heidstra *et al.* 2004).

HAIRY MERISTEM (HAM) aus Petunie gehört ebenfalls zur Familie der GRAS-Gene. Die GRAS-Gene gelten als putative Transkriptionsfaktoren und für einige Vertreter dieser Familie konnte eine Kernlokalisierung nachgewiesen werden (Nakajima *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Morohashi *et al.*, 2003). Die Proteine der HAM-Untergruppe in Reis und *A. thaliana* weisen keine „Nuclear Localisation Signal“ (NLS)-Sequenz auf (Tian *et al.*, 2004). Die *ham*-Mutante ist durch eine terminale Differenzierung des Sprossapikalmeristems charakterisiert. Dem HAM-Protein wurde eine Rolle als Antidifferenzierungssignal zugeordnet, welches das Apikalmeristem in einem undifferenzierten Zustand hält. Es wird angenommen, dass die Funktion von HAM auf einem nicht zellautonomen Mechanismus beruht (Stuurman *et al.*, 2002).

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die eine Funktion bei der Anlage von Lateralmeristemen ausüben und deren Mutation zu einer Verstärkung des *las-4* Verzweigungsdefekts führt. Es sollte das Gen, welches in der *enhancer of las-4 5 (eol5)*-Mutante durch EMS-Mutagenese verändert wurde, kartiert werden. In einem weiteren Ansatz sollte die Funktion der drei *HAM*-ähnlichen Gene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* bei der Anlage von Seitentrieben charakterisiert werden. Die Identifizierung von Verlustallelen aller drei *SCL*-Gene und deren Kombination in Doppel- und Tripelmutanten sollte eine mögliche Rolle bei der Anlage von Seitentrieben für jedes der drei *SCL*-Proteine aufdecken. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Expressionsmuster der drei *SCL*-Gene in *A. thaliana* mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung charakterisiert werden, um weitere Hinweise auf die Funktion der Gene zu bekommen. In den *scf*-Verlustmutanten sollten die Expressionsmuster bekannter Regulatoren der meristematischen Identität analysiert werden, um ein besseres Verständnis zu den Funktionen der Proteine *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* beim Prozess der Lateralmeristembildung zu bekommen. Aus dem gleichen Grund sollten auch Doppelmutanten zwischen dem *las-4*-Allel und jeweils einem *scf*-Verlustallel erzeugt und charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die wichtigsten Bezugsquellen für verwendete Chemikalien:

Amersham Pharmacia Biotec, Braunschweig

Biozym, Hess. Oldendorf

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Duchefa, Haarlem, Niederlande

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Merck, Feinchemikalien und Laborbedarf, Darmstadt

Roche, Mannheim

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.1.2 Enzyme

Die wichtigsten Bezugsquellen für verwendete Enzyme:

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

New England BioLabs GmbH, Schwalbach/Taunus

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Inkubationsröhrchen, Petrischalen, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg;

Objektträger, Deckgläser Sarstedt AG & Co, Nümbrecht;

Greiner Labortechnik, Essen

Kits zur Nukleinsäurebehandlung Qiagen, Hilden

2.1.4 Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment (aus Schaf), Roche, Basel, Schweiz

2.1.5 Organismen

2.1.5.1 Bakterien

Zur Klonierung von in Vektoren ligierten DNA-Fragmenten wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen verwendet (Hanahan, 1983). In den Experimenten wurde folgender *E. coli*-Stamm verwendet:

DH5a F- *end* A1 *hscR*17 (rk-, mk+) *gyrA*96 *relA*1 *supE*44 L- *recA*1
80dlacZM15 D (*lacZY* AargF) U196

2.1.5.2 Pflanzen

Die Analysen wurden an Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* Heynh. vom Ökotyp Columbia, Landsberg *erecta* oder Wassilewskija durchgeführt. Samenmaterial der verschiedenen Ökotypen und Mutanten wurde vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)*, vom *Institut nationale de la recherche agronomique (INRA)* oder vom *Zentrum zur Identifikation von Genfunktionen durch Insertionsmutagenese bei Arabidopsis thaliana (ZIGIA)* bezogen. Als *las*-Mutante wurde die Mutante mit dem Allel *las-4* verwendet, das eine Deletion von 20 bp bei bp 365 des offenen Leserasters aufweist (Greb *et al.*, 2003). Samen der *35S::mir171*-Linie wurden von Olivier Voinnet und Samen der *constans*-T-DNA-Insertionslinie von der Arbeitsgruppe George Coupland zur Verfügung gestellt.

Folgende Insertionsmutanten von *A. thaliana* wurden in dieser Arbeit verwendet:

Linie	NASC-Nr. / Donor	Ökotyp	Vektor / Insertion
SGT3425	N100299	Landsberg <i>erecta</i>	DS-GUS
7AS124	ZIGIA	Columbia	Enhancer-1
SALK_150134	N650134	Columbia	pROK2
FLAG_125E08	INRA	Wassilewskija	pGKB5
FLAG_239F0	INRA	Wassilewskija	pGKB5

2.1.6 Vektoren

Zur Klonierung von PCR-Produkten in *E. coli* für *In vitro* Transkriptionen wurde der Vektor pGEM-T (Promega Corporation, Madison, USA) verwendet.

2.1.7 Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden zur Synthese von RNA-ISH Sonden verwendet:

Name	Zielgen	Fragment	Enzym	Quelle
pTG21	Gegensinn-Sonde für <i>LAS</i>	2 - 1348 bp	EagI	Greb, 2003
pTG12	Gegensinn-Sonde für <i>STM</i>	78 - 1122 bp	SpeI	Greb, 2003
pTG53	Gegensinn-Sonde für <i>REV</i>	682 - 2611 bp	EcoRV	Greb, 2003
pSS4	Sinn-Sonde für <i>SCL6</i>	77 - 906 bp	SpeI	diese Arbeit
pSS5	Gegensinn-Sonde für <i>SCL6</i>	77 - 906 bp	SpeI	diese Arbeit
pSS6	Sinn-Sonde für <i>SCL27</i>	245 - 795 bp	SpeI	diese Arbeit
pSS7	Gegensinn-Sonde für <i>SCL27</i>	245 - 795 bp	SpeI	diese Arbeit
pSS8	Sinn-Sonde für <i>SCL22</i>	242 - 724 bp	SpeI	diese Arbeit
pSS9	Gegensinn-Sonde für <i>SCL27</i>	242 - 724 bp	SpeI	diese Arbeit

2.1.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden überwiegend von den Firmen metabion, Planegg-Martinsried, Invitrogen, Karlsruhe oder Operon, Köln bezogen.

Verwendete Oligonukleotide für Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP)-Marker-Experimente:

Name	Sequenz in 5' – 3' Orientierung	Chromosom
F21M12-F	GGCTTTCTCGAAATCTGTCC	1
F21M12-R	TTACTTTTTGCCTCTTGTCATTG	1
ciw12-F	AGGTTTTATTGCTTTTCACA	1
ciw12-R	CTTTCAAAGCACATCACA	1
ciw1-F	ACATTTTCTCAACCTTACTC	1
ciw1-R	GAGAGCTTCTTTATTTGTGAT	1
nga280-F	CTGATCTCACGGACAATAGTG C	1
nga280-R	GGCTCCATAAAAAGTGCACC	1
nga111-F	TGTTTTTTAGGACAAATGGCG	1

nga111-R	CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG	1
ciw3-F	GAAACTCAATGAAATCCACTT	2
ciw3-R	TGAACTTGTTGTGAGCTTTGA	2
nga1126-F	GCACAGTCCAAGTCACAACC	2
nga1126-R	CGCTACGCTTTTCGGTAAAG	2
nga361-F	ACATATCAATATATTAAGTAGC	2
nga361-R	AAAGAGATGAGAATTTGGAC	2
nga162-F	CATGCAATTTGCATCTGAGG	3
nga162-R	CTCTGTCACTCTTTTCCTCTGG	3
ciw11-F	CCCCGAGTTGAGGTATT	3
ciw11-R	GAAGAAATTCCTAAAGCATT	3
ciw4-F	GTTCAATAAAGTTGCGTGTGT	3
ciw4-R	TACGGTCAGATTGAGTGATT	3
nga6-F	TGGATTTCTCCTCTCTCAC	3
nga6-R	ATGGAGAAGCTTACACTGATC	3
ciw5-F	GGTTAAAAATTAGGGTTACGA	4
ciw5-R	AGATTTACGTGGAAGCAAT	4
ciw6-F	AATTTGGAGATTAGCTGGAAT	4
ciw6-R	CCATGTTGATGATAAGCACAA	4
ciw7-F	AATTTGGAGATTAGCTGGAAT	4
ciw7-R	CCATGTTGATGATAAGCACAA	4
nga1107-F	GCGAAAAAACAAAAAATCCA	4
nga1107-R	CGACGAATCGACAGAATTAGG	4
CTR1	CCACTTGTTTCTCTCTCTAG	5
CTR1	TATCAACAGAAACGCACCGAG	5
ciw8	TAGTGAAACCTTTCTCAGAT	5
ciw8	TTATGTTTTCTTCAATCAGTT	5
PHYC	CTCAGAGAATTCCCAGAAAAATCT	5
PHYC	AAACTCGAGAGTTTTGTCTAGATC	5
ciw9	CAGACGTATCAAATGACAAATG	5
ciw9	GACTACTGCTCAAATATTCCGG	5
MBK-5	GAGCATTTACAGAGACG	5
MBK-5	ATCACTGTTGTTTACCATTA	5

Verwendete Oligonukleotide für Cleaved Amplified Polymorphic Sequence- (CAPS) Marker-Experimente:

Name	Sequenz in 5' – 3' Orientierung	Chr.	Länge Temp.	Enzym
GBF3-F	AGCGAAGAAAATCACCCAAAGACAGACTC	2	1200 bp	HindIII
GBF3-R	CTCATTTCATTCTGTTTCTCCGTCAAGTG	2	58°C	HindIII
T6P5-4.8-F	TGAAAGACACCTGGGATAGGC	2	1366 bp	HindIII
T6P5-4.8-R	CCAACCTTCGGGTCGCTTCC	2	56°C	HindIII
MASC05493-F	TTGTGAGGTAAAGTGACTG	2	465 bp	DraI
MASC05493-R	AGTTTTTACGACCCTATCC	2	54,5°C	DraI
MASC02715-F	AGTTTCTCTGCCAATTCTC	2	525 bp	MfeI
MASC02715-R	ACAAGAAATTATTCGGGAGG	2	55,5°C	MfeI
MASC02492-F	CATTGTATCACAGCACAAAG	2	406 bp	TaqI
MASC02492-R	CTGAACATCTATGACAATCC	2	54°C	TaqI
MASC01892-F	TTAGTGGAAGAGGAGGATG	2	390 bp	MseI
MASC01892-R	TCAATCGAAAGCGAGAAG	2	55°C	MseI

Molekularer Marker zur Identifizierung des *las-4* Allels:

Name	Sequenz in 5' – 3' Orientierung	Polymorphismus
AtLS2427-F	TCCTCTCCCTTA ACTCTTCTCC	PCR Produkte von <i>las-4</i> sind 270 bp und vom WT-Allel 290 bp lang.
AtLS2717-R	CCGTAAATGACCGAACCGA	

Folgende Oligonukleotide wurden zur Synthese von RNA ISH-Sonden durch *in vitro* Transkription verwendet:

Name	Sequenz in 5' – 3' Orientierung	Locus
WUS-249-F	CGACGGAGCAAATCAAATC	At2g17950
WUS-249-F-T7	TAATACGACTCACTATAGGCGACGGAGCAAATCAAATC	At2g17950
WUS-887-R	GCATAGGGAAGAGAGGAAG	At2g17950
WUS-887-R-T7	TAATACGACTCACTATAGGGCATAGGGAAGAGAGGAAG	At2g17950
SCL6-16-F	GAAGAGTTTCAAGGGAAGG	At4g00150
SCL6-16-F-T7	TAATACGACTCACTATAGG	At4g00150
SCL6-293-R	CAATCACCCAACCCAATG	At4g00150
SCL6-293-R-T7	TAATACGACTCACTATAGGCAATCACCCAACCCAATG	At4g00150
SCL23-403-F	TCTGCCTTCGGTGTTTTTC	At2g45160
SCL23-403-F-T7	TAATACGACTCACTATAGGTCTGCCTTCGGTGTTTTTC	At2g45160

SCL23-625-R	GATCCGATAAAGGGAAAAC	At2g45160
SCL23-625-R-T7	TAATACGACTCACTATAGGGATCCGATAAAGGGAAAAC	At2g45160
SCL27-412-F	TTTGTGGGTTTCGACATC	At3g60630
SCL27-412-F-T7	TAATACGACTCACTATAGGTTTGTGGGTTTCGACATC	At3g60630
SCL27-625-R	ATCCGAGAACGGGAAAAC	At3g60630
SCL27-625-R-T7	TAATACGACTCACTATAGGATCCGAGAACGGGAAAAC	At3g60630
SCL6-77-F	CACCGTCGTCTCCGCTTTTGAGCC	At4g00150
SCL6-906R	GCCGTAGAAGATAGCCGCAG	At4g00150
SCL23-245-F	CGGTGGTACCACCGTCACCAA CAC	At2g45160
SCL23-795-R	GACTGGTCAT CGCCGGCCATTCC	At2g45160
SCI27-242-F	TGGTCCCAGCGGCGGCGGCTGCTGC	At3g60630
SCL27-724-R	GCTGACTGGTCTTGGTCTTGG	At3g60630

Folgende Oligonukleotide wurden zur molekularen Charakterisierung der Insertionsmutanten oder zur Sequenzierung verwendet. In Klammern ist die Position des Oligonukleotids relativ zum Startkodon angegeben.

Name	Sequenz in 5' – 3' Orientierung	Locus
At2g45160-F1 (61 bp)	GGGTTATTTTTTCTGGGTTTTTTG	At2g45160
At2g45160-F2 (781 bp)	GGTTCGTCGTC AACATCAG	At2g45160
At2g45160-R1 (1948 bp)	AACGTGAAACCCTCTCACC	At2g45160
At2g45160-R2 (820 bp)	GAATTGTTGTTGCTGGTTGTTG	At2g45160
SCL23-897-F	GCTCAATCACCATCTCAACAC	At2g45160
SCL23-1219-R	TCTTCTTCTTCTCCAA	At2g45160
At3g60630-F1(139 bp)	AGCTTTCATCTTCGTCTTCCTC	At3g60630
At3g60630-F2 (200 bp)	TCGTCTCTTCTTCAACCACC	At3g60630
At3g60630-R1 (2043 bp)	ACAAGTGAAGGCGACGAAG	At3g60630
At3g60630-R2 (1414 bp)	GGAAACGAAGTATCAATGGGAG	At3g60630
SCL27-1193R	TTGAAGGAGAAGCGAAAAG	At3g60630
SCL27-220-F	ACGCTGTCTTCTTCTCAC	At3g60630
SCL27-700-R	CTGGTCTTGGTCGTTTTG	At3g60630
SCL27-692-rev	GGTCGTTTTGGTCTTCTC	At3g60630
SCL27-1426-F	CTTCGTTTCTCAAGCAAATC	At3g60630
SCL27-1553-R	TCGAGCAGAGATGTGTAG	At3g60630
S6-F (117bp)	CGGCGAAGAA GAAGAGGAAG	At4g00150
S6-R (1789)	TGCCAACATA GGAGAAGTGAG	At4g00150
At4g00150-R1 (816 bp)	GCTCTCTATG ACCTCTGCTG	At4g00150
SCL6-1582-R	TCTTCTCGACGTGAAAGCC	At4g00150

SCL6-1243-R	GTGAAGCATCTATCTCCGAC	At4g00150
LB-INRA	CGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGT	T-DNA
SALK-LB	TCG GAACCACCATCAAAC	T-DNA
EN-247-R	CAGGGAGAAAGGAGAGAAGAAG	En-1

Das Gen *SCL27* (At2g45160) wurde zu Beginn dieser Arbeit mit *SCL23* bezeichnet und das Gen *SCL22* (At3g60630) mit *SCL27*. Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird ausschließlich die neuere Nomenklatur verwendet. Folglich sind Primer mit dem Namen *SCL23* spezifisch für das Gen *SCL27* und solche mit dem Namen *SCL27* spezifisch für das Gen *SCL22*.

2.1.9 Puffer und Kulturmedien

Stocklösungen der folgenden Puffer und Kulturmedien wurden nach Sambrook und Russel (2001) hergestellt: BSA, Denhardt's Solution, PBS, PCR Buffer, SDS, SSC, TAE, TE, LB. Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden mit Milli-Q-Wasser (Millipore Waters GmbH, Neu-Isenburg) angesetzt und, falls erforderlich, für 20 min bei 121°C autoklaviert.

2.1.10 Computerprogramme und Datenbanken

Die Sequenzanalyse erfolgte mittels der Software des UWGCG Programmpakets (Genetics Computer Group, 1997). Die Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* Bethesda, USA oder der *Arabidopsis Information Resource (TAIR)* wurden für die Sequenzsuchen und -vergleiche verwendet. SSLP- und CAPS-Marker wurden der *MASC SNP* Datenbank des *Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung (MPIZ)* (Schmid *et al.*, 2003; Törjék *et al.*, 2003) oder der *TAIR* Datenbank entnommen. Die Datenbank des *Arabidopsis Small RNA Project (ASRP)* diente als Quelle für Informationen zu *miR171*.

2.2 Methoden

Alle nicht beschriebenen gängigen Labormethoden wurden nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt.

2.2.1 Genetische Kartierung

Die Verwendung der SSLP-Marker zur Kartierung erfolgte nach der Methode von Lukowitz *et al.* (2000). Mittels dieser Marker war es möglich, Sequenzpolymorphismen, die auf Längenunterschieden in der Sequenz zwischen zwei Ökotypen basieren, zu detektieren. Die Marker wurden in PCR-Ansätzen verwendet und die Polymorphismen durch Größenunterschiede der amplifizierten Fragmente in einer Gelelektrophorese detektiert. Zusätzlich wurden Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)-Marker eingesetzt. Die in einer PCR amplifizierten Sequenzabschnitte verschiedener Ökotypen unterscheiden sich im Vorkommen einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym. In einem Restriktionsansatz entstehen unterschiedliche Fragmente, die aufgrund der Größenunterschiede durch Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können. CAPS-Marker wurden, wie in der Tabelle von Oligonukleotiden für CAPS-Marker angegeben, verwendet.

2.2.2 Isolierung von genomischer DNA

Die Aufreinigung genomischer Pflanzen-DNA zur Genotypisierung oder zur Analyse der Segregation erfolgte nach der Methode von Edwards (1991). Qualitativ hochwertige DNA wurde mit Hilfe des *DNeasy® 96 Plant Kits* (Qiagen, Hilden) isoliert.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte unter Verwendung des *Plasmid Mini* bzw. *Midi Kits* (Qiagen).

2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt.

2.2.5 Isolierung von RNA aus Pflanzen

Die Isolierung von RNA aus Pflanzen erfolgte mittels des *RNeasy Plant Mini Kits* (*Qiagen*). Anschließend wurde die RNA einem DNase-Verdau unterzogen und durch Verwendung des *Protocols for RNA cleanup* (*Qiagen*) gereinigt.

2.2.6 cDNA-Synthese / RT-PCR

Zur cDNA-Synthese aus zuvor isolierter RNA wurde das *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* von Fermentas nach dem Herstellerprotokoll verwendet. Für die cDNA-Synthese wurden ca. 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. 1 µl der cDNA wurde in einer anschließenden PCR verwendet.

2.2.7 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) diente der gezielten Amplifikation von DNA-Abschnitten. Wenn nicht anders angegeben, wurde eine PCR-Reaktion wie folgt angesetzt:

ca. 20 ng	DNA
25 mM	dNTP
10-25 pmol	Forward Primer
10-25 pmol	Reverse Primer
3 mM	MgCl ₂
5 µl	10 x PCR-Puffer (Sambrook und Russel, 2001)
1 µl	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase (Taq)
mit H ₂ O zu 50 µl auffüllen	

Die Polymerase Ketten Reaktion wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra) oder dem Multicycler PTC 225 (Biozym), wenn nicht anders angegeben, wie folgt durchgeführt:

1. Denaturierung	94°C	2 min
2. Denaturierung	94°C	15 s
3. Annealing	60°C	15 s
4. Extension	72°C	1 min/kb
5. Extension	72°C	5 min

Die Schritte 2-4 wurden in der Regel 30 mal wiederholt.

2.2.8 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden durch die MPIZ Service-Einheit *Automatische DNA Isolierung und Sequenzierung* (ADIS) auf *Applied Biosystems* (Weierstadt) *Abi Prism 377* und *3700* Sequenzierern mittels *BigDye-terminator* chemistry durchgeführt. Reagenzien wurden von *Applied Biosystems* bezogen.

2.2.9 Inkubationsbedingungen für Bakterien

E. coli wurden in LB-Medium bei 37°C über Nacht (Sambrook und Russell, 2001) inkubiert. Zur Platteninkubation wurde das LB-Medium mit 1 % Agar verfestigt. Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

2.2.10 Wachstumsbedingungen für Pflanzen

A. thaliana Pflanzen wurden bei einer Tagestemperatur von 20-25°C und einer Nachttemperatur von 10-15°C im Gewächshaus oder in einer Klimakammer gehalten. Kurztagbedingungen wurden durch einen Tag-Nacht-Zyklus von 8 h Licht und 16 h Dunkelheit und Langtagbedingungen durch einen Zyklus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit erzeugt.

2.2.11 Transformation von Bakterien

Transformationen von Vektoren in *E. coli* wurden nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.2.12 RNA *In Situ* Hybridisierung

2.2.12.1 Herstellen der RNA-ISH-Sonden

Die Herstellung der RNA-Sonden erfolgte einerseits durch Klonierung der PCR-Fragmente in den Vektor pGEM-T. Die Fragmente wurden entweder in Sinn- oder Gegensinn-Orientierung relativ zum T7-Promotor in den Vektor kloniert. Andererseits wurden PCR-Produkte, die den T7-Promotor enthielten, als Vorlage für die Synthese verwendet. Für die RNA-Synthese wurde das *T7 Transcription Kit*, Fermentas (St. Leon-Rot) oder das *MAXIscrip[®] T7 Kit*, Ambion (Austin, USA) verwendet. Je 1 µg linearisierter Vektor oder 1 µg PCR-Produkt wurde für die Transkription durch die T7-Polymerase eingesetzt. Die Markierung der Sonden erfolgte durch Einbau von Digoxigenin-UTP (Dig-UTP).

2.2.12.2 Sequenzbereiche der verwendeten RNA-ISH-Sonden

Für alle Sonden wird die Position bezüglich des Startkodons auf der cDNA angegeben. *WUS*-Sonden wurden mittels eines PCR-Produkts als Vorlage für die T7-Polymerase synthetisiert und enthielten die bp 249 bis 887 der kodierenden Sequenz. *SCL6*, *SCL22* und *SCL27*-Sonden, die mittels eines PCR-Produkts als Vorlage durch die T7-Polymerase synthetisiert wurden, umfassten die bp 16 bis 293 (*SCL6*), 412 bis 625 (*SCL22*) oder 403 bis 625 (*SCL27*). *SCL6*, *SCL22* und *SCL27*-Sonden, für die linearisierte Vektoren als Vorlage eingesetzt wurden, beinhalteten die bp 77 bis 906 (*SCL6*), 242 bis 724 (*SCL22*) und 245 bis 795 (*SCL27*).

2.2.12.3 Vorbereitung und Durchführung der RNA-ISH

Das Pflanzenmaterial und die Herstellung von Schnitten (8 µm) wurden, wie von Coen *et al.* (1990) beschrieben, durchgeführt. Modifizierungen des Protokolls wurden durch Zusatz von 0,03% Tween 20 zum Fixierungspuffer vorgenommen. Die Entwässerung des Materials nach der Fixierung erfolgte ohne Zugabe von NaCl. Die nachfolgenden Schritte bis zur Einbettung des Materials in Paraplast+ (Kendall) wurden mit Hilfe des ASP300 Tissue Processors (Leica) durchgeführt. Die RNA-Sonden wurden nicht hydrolisiert. Die Schnitte wurden im Anschluss der Farbreaktion mit 30 % Glycerin bedeckt und mittels *Differential Interference Contrast* (DIC) unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

2.2.13 Kreuzungen von Pflanzen

Wenn nicht anders angegeben, wurden wechselseitige Kreuzungen durchgeführt. Die Präparation der Blüte als Pollenempfänger erfolgte durch vollständiges Entfernen der Sepalen, Petalen und Stamen. Das freigelegte Gynoezeum wurde am folgenden Tag durch Donor-Pollen bestäubt. Für eine effiziente Befruchtung wurde die Bestäubung am zweiten Tag nach der Freilegung der Blüte wiederholt. Molekulare Marker wurden genutzt, um auf Hetero- bzw. Homozygotie der mutanten Allele zu testen.

2.2.14 Phänotypische Charakterisierung der Pflanzen

Die detaillierte Auswertung der Seitentriebbildung erfolgte mit Hilfe eines Binokulars. Die Rosette wurde von der Infloreszenz getrennt und, ausgehend vom ältesten Rosettenblatt, jede einzelne Blattachsel auf das Vorhandensein einer Achselknospe untersucht. Das ausgewertete Rosettenblatt wurde entfernt, um das nächstfolgende jüngere Rosettenblatt zugänglich zu machen. Die Länge der primären Infloreszenz und die Anzahl an Stängelblättern wurden im Zustand der Samenreife untersucht. Der Blühzeitpunkt wurde anhand der Zahl von Rosettenblättern und durch die Anzahl der Tage bis zur Anthese ermittelt.

2.2.15 Elektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde mit Unterstützung von Rolf-Dieter Hirtz an einem DSM 940 Elektronenmikroskop (Zeiss) durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und im Vakuum mit einer Platinschicht bedampft.

3. Ergebnisse

3.1 Kartierung des *eo15*-Locus

3.1.1 Vorarbeiten zu *eo15*

Die Funktionsanalyse eines Gens bei einem bestimmten Entwicklungsschritt kann erschwert sein, wenn die fehlende Genaktivität in Verlustmutanten durch redundante Aktivitäten anderer Gene kompensiert wird. Ein solcher Fall wurde für die *las-4*-Mutante beschrieben (Greb *et al.*, 2003; Clarenz, 2004). Die Analysen des *las-4*-Phänotyps verdeutlichten, dass der Funktionsverlust des Proteins LATERAL SUPPRESSOR (LAS) lediglich in der vegetativen Phase zu Abweichungen vom Verzweigungsmuster des Wildtyps führt. Die Untersuchungen von Doppelmutanten zwischen *las-4* und *ap1* zeigten allerdings, dass LAS auch innerhalb der reproduktiven Phase der Entwicklung eine Funktion besitzt (Greb *et al.*, 2003; Clarenz, 2004). Um weitere Gene zu identifizieren, die ebenfalls bei der Achselmeristembildung eine Funktion ausüben, wurde eine EMS vermittelte Mutagenese an homozygoten *las-4*-Samen durchgeführt (Clarenz, 2004). Im Gegensatz zu T-DNA-Insertionsmutanten führt eine EMS Behandlung in der Regel zu Punktmutationen, welche einen schwächeren oder stärkeren Effekt auf den zu untersuchenden Entwicklungsschritt haben können.

Die Nachkommen der mutagenisierten *las-4*-Pflanzen wurden nach Verstärkern (Enhancern) des *las-4*-Phänotyps durchmustert (Clarenz, 2004). Enhancer-Mutationen können die Funktion von Genen aufdecken, die für redundante Aktivitäten zum ersten Gen (hier *LAS*) kodieren. Möglich ist auch, dass die Genprodukte vom ersten Gen und dem neu mutierten Gen im Wildtyp physikalisch interagieren (Page und Grossniklaus, 2002). Da die Mutationen den *las-4*-Phänotyp verstärkten, wurden die Mutanten *enhancer of las-4 (eol)* genannt (Clarenz, 2004). Die Ergebnisse der Durchmusterung der EMS-mutagenisierten Population und erste Charakterisierungen der *eo11*, *eo13*, *eo15* und *eo16*-Mutanten wurden in der Arbeit von Clarenz (2004) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur Grob- und Feinkartierung des *eo15*-Locus durchgeführt. Diese werden im folgenden Kapitel beschrieben.

3.1.2 Phänotyp der *eo15*-Linie

Der Phänotyp der *eo15*-Pflanzen unterscheidet sich von dem der *las-4*-Pflanzen durch eine veränderte Verzweigung während der reproduktiven Phase der Entwicklung (Clarenz, 2004). Im Gegensatz zur *las-4*-Mutante ist die Anlage von Seitentrieben in den Achseln von Stängelblättern in *eo15*-Pflanzen stark reduziert (Abb. 3-1). Die Auskreuzung der *las-4*-Mutation zeigte, dass das *eo15*-Allel nicht zur Ausprägung eines Verzweigungsdefekts führt und der Phänotyp der *eo15*-Mutante nur in Kombination mit der *las-4*-Mutation in Erscheinung tritt. Dieser Phänotyp konnte außerdem nur dann beobachtet werden, wenn die Pflanzen länger als 4 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen wurden (Clarenz, 2004). Die Blätter von *eo15*-Pflanzen waren kleiner als die von *las-4*-Pflanzen und die *eo15*-Pflanzen zeigten eine spätere Seneszenz. Zusätzlich konnte ein früherer Blühzeitpunkt für die *eo15*-Pflanzen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist die längere Infloreszenz der *eo15*-Pflanzen im Vergleich zur *las-4*-Mutante.



Abb. 3-1 Darstellung einer *las-4*-Pflanze im Vergleich zu einer *eo15*-Mutante.

Habitus einer *las-4*-Pflanze (links) im Vergleich zur *eo15*-Mutante (rechts).

3.1.3 PCR basierte Marker für die Kartierung des *eo15*-Locus

Für die Kartierung des *eo15*-Locus wurden „Simple Sequence Length Polymorphism“ (SSLP)-Marker verwendet (Lukowitz *et al.*, 2000). Zusätzlich wurden einige SSLP-Marker durch „Cleaved Amplified Polymorphic Sequence“ (CAPS)-Marker ersetzt. In der folgenden Abbildung 3-2 werden die verwendeten SSLP- und CAPS-Marker mit ihrer chromosomalen Position auf den fünf Chromosomen von *A. thaliana* dargestellt.

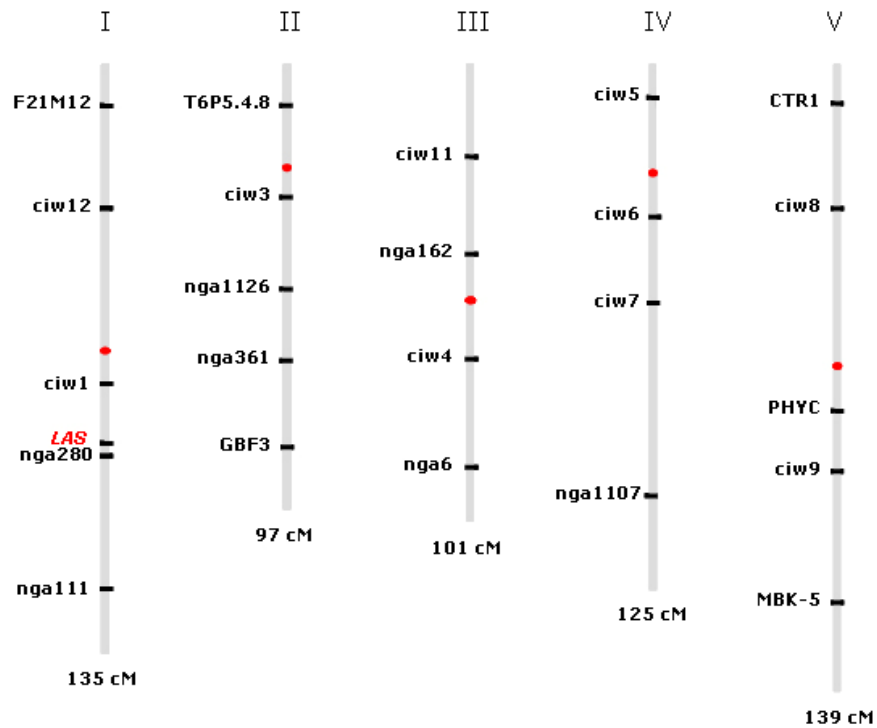


Abb. 3-2 Schematische Darstellung der Positionen der verwendeten SSLP- und CAPS-Marker auf den fünf Chromosomen von *A. thaliana*. Jedes Chromosom wird als Balken und die Region des Centromers als roter Kreis dargestellt. Es wurden SSLP- und CAPS-Marker ausgewählt, die relativ gleichmäßig über alle 5 Chromosomen verteilt waren. Auf Chromosom 1 wurde zudem der *LATERAL SUPPRESSOR*-Locus gekennzeichnet (*LAS*).

3.1.4 Kartierung des *eo15*-Locus in einer F₂-Kartierungspopulation

Die EMS-Mutagenese wurde mit homozygoten *las-4*-Samen im Col-0-Hintergrund durchgeführt. Um den *eo15*-Locus kartieren zu können, wurde die *eo15*-Mutation im Hintergrund der *las-4*-Mutante in einen anderen Ökotyp, der Sequenzpolymorphismen zu Col-0 aufweist, gekreuzt. Als genetischer Hintergrund zur Etablierung der Kartierungspopulation wurden Pflanzen vom Ökotyp Landsberg *erecta* (*Ler*) gewählt. Die bekannten Sequenzpolymorphismen zwischen den beiden Ökotypen erlauben eine Grob- und Feinkartierung des *eo15*-Locus. In der Literatur wurde beschrieben, dass Sequenzunterschiede zwischen Col-0 und *Ler* in 4 bis 11 Positionen pro 1000 bp detektiert werden können (Hardtke *et al.*, 1996).

Eine grobe Kartierung des *eo15*-Locus wurde an einer F₂-Generation der *eo15/las-4* x *Ler*-Kartierungskreuzung durchgeführt. In dieser Kartierungspopulation wurden 541 Pflanzen analysiert. Die *las-4* und *eo15*-Mutationen werden rezessiv vererbt (Clarenz,

2004). Daher wurde eine Segregation von 9:3:3:1 erwartet. 12 von 16 Pflanzen sollten ein Verzweigungsmuster des Wildtyps aufweisen. Für 3 von 16 Pflanzen wurde der Phänotyp *las-4*-Mutante erwartet und 1 von 16 Pflanzen sollte den *eo15*-Verzweigungsdefekt ausbilden.

Es stellte sich jedoch heraus, dass die tatsächliche Anzahl an Pflanzen, die den *eo15*-Verzweigungsphänotyp zeigten, höher lag. So konnte in 49 Pflanzen anstatt der berechneten 34 Pflanzen ein *eo15*-Verzweigungsphänotyp gefunden. Auch die Anzahl an Pflanzen mit einem *las-4*-Phänotyp entsprach nicht der erwarteten Verteilung. So konnten nur 41 anstatt der berechneten 101 Pflanzen diesem Phänotyp zugeordnet werden (Tab. 3-1). Zusätzlich wurden auch Phänotypen gefunden, die nicht eindeutig Merkmale des *las-4* oder *eo15*-Phänotyps trugen, sondern entweder eine leichte Verstärkung des *las-4* oder eine schwache Reduzierung des *eo15*-Phänotyps zeigten. Die Anzahl an Pflanzen, die diesen gemischten Phänotyp aufwies, der als intermediär bezeichnet wurde, entsprach in etwa der Differenz zur erwarteten Anzahl von 101 *las-4*-Pflanzen. In den folgenden Beschreibungen und Tabellen wird diese Phänotypenklasse als intermediär bezeichnet.

Phänotypen der F2-Kartierungspopulation (n=541)	Wt	<i>las-4</i>	<i>eo15</i>	intermediär
erwartete Segregation	406	101	34	-
tatsächliche Segregation	387	41	49	64

Tab. 3-1 Auswertung der Segregationsereignisse der F2-Kartierungspopulation von *eo15/las-4* x *Ler*. Gegenübergestellt sind die erwarteten Zahlen der Segregation und die tatsächlich beobachtete Anzahl an Pflanzen der drei erwarteten Phänotypenklassen Wt, *las-4* und *eo15*. Intermediäre Phänotypen wurden nicht erwartet und wurden für die Berechnung der erwarteten Segregation nicht berücksichtigt.

Von den 49 in dieser Population gefundenen Pflanzen, die einen starken *eo15*-Phänotyp zeigten, wurden 42 für die weitere Kartierung des *eo15*-Locus verwendet. Eingesetzte SSLP-Marker, die im Experiment keine eindeutige Aussage über eine Segregation für ein *Ler* oder Col-0-Allel zuließen, wurden durch CAPS-Marker ersetzt (Kapitel 2.2).

Ein deutlicher Hinweis darauf, dass die ausgewählten *eo15*-Pflanzen tatsächlich homozygot für die *las-4*-Mutation waren, war die Beobachtung, dass für den Marker nga280, der flankierend zum *LAS*-Gen auf Chromosom 1 liegt, eine 100 prozentige Kosegregation mit dem Col-0-Allel festgestellt werden konnte. Interessanterweise zeigt auch der Marker nga111 zu 100 Prozent das Col-0-Allel an (Abb. 3-3, A). Diese Beobachtung wurde ebenfalls in dem *eo13*-Kartierungsexperiment von Clarenz (2004)

dokumentiert. Die Kartierungsdaten der *eo15/las-4* x *Ler* F2-Population deuteten darauf hin, dass *EOL5* auf Chromosom 2 lokalisiert ist. Allerdings konnte nur für 80 Prozent der Pflanzen eine Kosegregation der Marker *nga1126* und *nga361* mit dem *eo15*-Phänotyp gefunden werden (Abb. 3-3, B).

Die Segregationsverhältnisse der analysierten Marker für die Chromosomen 3, 4 und 5 zeigten, dass für keines dieser drei Chromosomen eine Kosegregation des *eo15*-Phänotyps mit einem Col-0-Allel detektiert werden konnte (Abb. 3-3, C). Mittels Markeranalyse mit den Markern *CTR1* und *ciw8* wurde die Segregation eines *Ler*-Allels des Chromosoms 5 mit dem *eo15*-Phänotyp gefunden. Vermutlich befindet sich auf dem oberen Arm von Chromosom 5 ein „quantitative trait locus“ (QTL), der sich auf die Verzweigung auswirkt und den *las-4*-Phänotyp verstärkt (Abb. 3.3; C).

		Chromosom 1				
Marker		F21M12	ciw12	ciw1	nga280	nga111
Position (cM)		10	39	72	81	113
% Columbia		59,5	63,4	90,5	100	100
% <i>L. erecta</i>		40,5	36,6	9,5	0	0

		Chromosom 2				
Marker		T6P5-4.8	ciw3	nga1126	nga361	GBF3
Position (cM)		11	30	50	65	70
% Columbia		73,9	77,7	79,3	79,4	68,3
% <i>L. erecta</i>		26,1	22,3	20,7	20,6	31,7

		Chromosom 3				Chromosom 4				Chromosom 5				
Marker		nga162	ciw11	ciw4	nga162	ciw5	ciw6	ciw7	nga1107	CTR1	ciw8	PHYC	ciw9	MBK-5
Position (cM)		20	43	70	86	10	47	65	105	10	42	71	88	115
% Columbia		34,1	36,6	45,2	45	52,4	63,5	45,2	38,1	30,1	29,3	42,8	41,5	45,2
% <i>L. erecta</i>		65,9	63,4	54,8	55	47,6	36,5	54,8	61,9	79,9	70,7	57,2	58,5	54,8

Abb. 3-3 Auswertung der molekularen Analyse von 42 Pflanzen des *eo15*-Phänotyps aus der beschriebenen F2-Kartierungspopulation.

(A-C) Es sind die Segregationsverhältnisse für Chromosom 1 (A), Chromosom 2 (B), sowie die Chromosomen 3, 4 und 5, (C) dargestellt. In der ersten Zeile sind die jeweiligen Marker genannt. Für jeden Marker wurde die Position in cM und der prozentuale Anteil, mit dem ein *Ler* oder Col-0-Allel oder gefunden wurde, angegeben.

Es wurde angenommen, dass ein möglicher Grund für die unerwartet hohe Anzahl von Pflanzen mit einem intermediären Phänotyp zwischen *las-4* und *eo15* in der F2-Kartierungspopulation auf dem Effekt eines auf Chromosom 5 lokalisierten QTL beruhte. Dies würde erklären, warum kein Col-0-Allel zu 100 Prozent mit dem *eo15*-

Phänotyp kosegregierte. Durch die Wirkung des QTL auf Chromosom 5 würden auch Pflanzen, die eine Heterozygotie für den *eo15*-Locus besitzen, einen *eo1*-Phänotyp ausbilden.

Diese Annahme wurde im folgenden Experiment überprüft. Aus der F₂-Kartierungspopulation wurden speziell solche *eo15*-Pflanzen selektiert, die einen starken *eo15*-Phänotyp zeigten. Ein weiteres Kriterium war, dass diese Pflanzen für die Marker *nga1126* und *nga361* entweder homozygot für das Col-0 oder *Ler*-Allel sein sollten oder aber für diese Marker eine Heterozygotie aufweisen sollten (Tab. 3-2). Außerdem sollten diese Pflanzen für die Marker *CTR1* und *ciw8* heterozygot oder homozygot für das *Ler*-Allel sein. Es wurden je zwei Pflanzen ausgewählt, die für die beiden Marker *nga1126* und *nga361* homozygot für das Col-0-Allel waren. Außerdem wurden je zwei Pflanzen ausgewählt, die eine Heterozygotie für einen der beiden Marker zeigten und für den jeweils anderen Marker homozygot waren (Tab. 3-2). Diese Pflanzen wurden eigenbestäubt und die Phänotypen der Nachkommen dieser Pflanzen unter Kurztagbedingungen untersucht.

Pflanzen der F ₂ -Kartierungspopulation mit <i>eo15</i> -Phänotyp	4C5	2E2	3I6	1A1
Marker	Genotyp 4C5	Genotyp 2E2	Genotyp 3I6	Genotyp 1A1
<i>nga1126</i>	Col-0/ <i>Ler</i>	Col-0	Col-0	Col-0
<i>nga361</i>	Col-0	Col-0/ <i>Ler</i>	Col-0	Col-0
<i>CTR1</i>	<i>Ler</i>	<i>Ler</i>	<i>Ler</i>	Col-0/ <i>Ler</i>
<i>ciw8</i>	<i>Ler</i>	<i>Ler</i>	Col-0/ <i>Ler</i>	<i>Ler</i>

Tab. 3-2 Genotypen der ausgewählten *eo15*-Pflanzen der F₂-Kartierungspopulation für die Marker *nga1126*, *nga361*, *CTR1* und *ciw8*. Die erste Spalte listet die verwendeten Marker auf. In der ersten Zeile sind die vier *eo15*-Pflanzen der F₂-Kartierungspopulation angegeben. Die molekulare Analyse jeder einzelnen Pflanze für die vier selektierten Marker wird in der jeweiligen Spalte zusammengefasst.

Es wurde angenommen, dass Nachkommen der Pflanzen 4C5 und 2E2, die jeweils heterozygot für einen der beiden Marker *nga1126* oder *nga361* waren, sich aufspalteten und ebenfalls *las-4*-Phänotypen ausbildeten. Die Folgegeneration der F₂-Pflanzen 3I6 und 1A1 sollte dagegen keine Aufspaltung der Phänotypen zeigen und nur Pflanzen des *eo15*-Phänotyps ausbilden. Für die Nachkommen der Pflanzen 4C5 und 2E2 zeigte sich eine Aufspaltung der Phänotypen. Es bildeten sich sowohl Pflanzen des *eo15*, als auch des *las-4*-Phänotyps aus (Tab. 3-3). Die Anzahl an *las-4*-Pflanzen war allerdings geringer als erwartet. Ein möglicher Grund hierfür könnte in der Wirkung des QTL

auf Chromosom 5 begründet liegen, da auch Phänotypen gefunden wurden, die einen schwachen *eo15*-Phänotyp zeigten. Diese Phänotypenklasse wurde in Tabelle 3-3 mit intermediär bezeichnet.

Die Nachkommen der Pflanzen 3I6 und 1A1, die für die Marker nga1126 und nga361 eine Homozygotie für das Col-0-Allel zeigten, konnten nur dem *eo15*-Phänotyp zugeordnet werden (Tab. 3-3). Dies war ein Hinweis dafür, dass der *eo15*-Locus in diesem Bereich von Chromosom 2 lokalisiert ist und unterstützt außerdem die Annahme, dass der QTL auf Chromosom 5 die Anlage von Seitentrieben in einem *las-4*-Hintergrund negativ beeinflusst.

Phänotyp (F3)	<i>eo15</i>	<i>las-4</i>	intermediär
F2-Pflanze			
4C5	27	9	11
2E2	21	4	15
3I6	46	0	0
1A1	48	0	0

Tab. 3-3 Analyse der Segregationen von *eo15*, *las-4* und intermediären Phänotypen in der Folgegeneration der vier F2-Pflanzen 4C5, 2E2, 3I6 und 1A1 der F2-Kartierungspopulation. Die erste Spalte gibt die vier verschiedenen Pflanzen der F2-Kartierungspopulation an. Die erste Zeile listet die drei segregierenden Phänotypen *eo15*, *las-4* und intermediär auf. Für jede Pflanze ist die Anzahl segregierender Pflanzen eines bestimmten Phänotyps angegeben.

3.1.5 Etablierung neuer Populationen zur Kartierung des *eo15*-Locus

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.3 zeigten, dass wahrscheinlich ein *Ler*-QTL des Chromosoms 5 den *las-4*-Phänotyp verstärkte. Im Folgenden sollte eine Kartierungspopulation etabliert werden, die eine eindeutigere Segregation des *eo15*-Phänotyps zeigt. Außerdem sollte in dieser Kartierungspopulation die Wirkung des *Ler*-QTL auf den *las-4*-Phänotyp reduziert werden. Durch Rückkreuzungen von *eo15* sollte der Einfluss des *Ler*-Hintergrunds auf den *las-4*-Phänotyp minimiert werden.

Zur Etablierung von Rückkreuzungspopulationen wurden aus der F2-Kartierungspopulation mehrere *las-4*-phänotypische Pflanzen mittels eines molekularen Tests, der im Zuge dieser Arbeit etabliert wurde (Kap. 2.2), selektiert. Alle ausgewählten Pflanzen waren homozygot für das *las-4*-Allel. Im Folgenden wurden die ausgewählten homozygoten *las-4*-Pflanzen (*las-4/las-4*) zu homozygoten *eo15/las-4*-Pflanzen (*eo15/eo15/las-4/las-4*) rückgekreuzt. Die Segregationsverhältnisse dieser Kreuzung

wurden anschließend unter Kurztagbedingungen analysiert. Die Population wurde als Rückkreuzungspopulation-1 der Generation 1 (*eo15*-BC1F1-Population) bezeichnet. Die Analyse der Segregation in der *eo15*-BC1F2-Population zeigte, dass die Verteilungen der Phänotypen dicht an den Erwartungen einer 3:1 Aufspaltung lagen (Tab. 3-4).

Phänotypen der <i>eo15</i> -BC1F2-Population (n=33)	<i>las-4</i>	<i>eo15</i>	intermediär
erwartete Segregation	25	8	-
tatsächliche Segregation	23	6	4

Tab. 3-4 Analyse der Segregationen von *las-4*, *eo15* und intermediären Phänotypen in der *eo15*-BC1F2-Population. Gegenübergestellt sind die berechneten Zahlen der Segregation und die tatsächlich beobachtete Anzahl an Pflanzen der erwarteten Phänotypenklassen für *las-4* und *eo15*.

Aus der *eo15*-BC1F1-Population, die eine 1:1 Segregation der beiden Phänotypen *las-4* und *eo15* zeigte, wurden erneut solche Pflanzen selektiert, die einen *las-4*-Phänotyp aufwiesen. Alle Pflanzen, die homozygot für die *las-4*-Mutation waren, wurden erneut zu homozygoten *eo15*-Pflanzen gekreuzt, um die Rückkreuzungspopulation-2 (*eo15*-BC2F1) zu etablieren. In dieser Population spalteten sich die zwei Phänotypen wieder in einem Verhältnis von 1:1 auf. Aus der Population *eo15*-BC2F1 wurden Pflanzen des *las-4*-Phänotyps gewählt, um die Aufspaltung der Phänotypen der folgenden Generation zu untersuchen. Die Segregationen für die Nachkommen dieser Pflanzen wurden während des Verfassens der vorliegenden Arbeit in *eo15*-BC2F2-Populationen analysiert.

Zur Feinkartierung des *eo15*-Locus werden in zukünftigen Experimenten die *eo15*-BC1F2- und *eo15*-BC2F2-Populationen verwendet. Neue molekulare Marker, die Polymorphismen zwischen Col-0 und Ler im Bereich der beiden Marker nga1126 und nga360 des Chromosoms 2 unterscheiden und für eine Feinkartierung des *eo15*-Locus verwendet werden können, wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert (Kap. 2.2.).

3.2 Einfluss von *HAIRY MERISTEM*-ähnlichen Genen aus *A. thaliana* auf die Sprossarchitektur und den Erhalt von Meristemen

3.2.1 Analyse des Verzweigungsmusters von *35S::miR171*-Pflanzen

Die folgenden Kapitel fassen die Arbeiten zur Analyse der *HAIRY MERISTEM* (*HAM*)-ähnlichen Gene in *A. thaliana* zusammen. Der Anlass zur Studie dieser Gene in Bezug auf die Seitentriebbildung war die Erscheinungsform einer transgenen Linie, in der eine *microRNA171* unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus exprimiert wurde (Parizotto *et al.* 2004). Diese Linie zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine Änderung der Sprossarchitektur (Abb. 3-4, E-F), die dem *eo/5*-Phänotyp unter Kurztagbedingungen glich (Kap. 3.1). Bei dem in der transgenen Linie überexprimierten *microRNA*-Gen handelt es sich um das Gen der *microRNA171a* (*miR171a*). In dieser Linie wurde eine 1840 bp umfassende intergenische Sequenz, die zwischen den Genen *At3g51370* und *At3g51380* lokalisiert war, unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert (Parizotto *et al.* 2004).

microRNAs treten in Genfamilien auf, die mehrere Loci umfassen (Reinhardt *et al.*, 2002). Zur *miR171* Familie werden drei Loci (a, b, c) gezählt, die auf zwei unterschiedlichen Chromosomen liegen (Jones-Rhoades *et al.*, 2004). Der *miR171a*-Locus befindet sich auf dem Chromosom 3 (*At3g51375*). Ein Vergleich der Expressionsstärke von *miR171a*, *miR171b* und *miR171c* zeigt, dass *miR171a* das höchste Expressionslevel aufweist (<http://asrp.cgrb.oregonstate.edu>). Dabei wurde die stärkste Expression für *miR171a* in Keimlingen gefunden. Die Expression in den Blüten war im Gegensatz dazu um circa 75 Prozent reduziert und in den Blättern betrug die Expression der *miR171a* nur ein Fünftel im Vergleich zur Expression in Keimlingen. Die Expressionslevel von *miR171b* und *miR171c* sind in Blättern oder Blüten im Vergleich zu *miR171a* etwa um den Faktor 50 und in Keimlingen um den Faktor 25 geringer.

Für *miR171* wurden drei Zielsequenzen im Genom von *A. thaliana* gefunden. Die drei Loci kodieren für Gene, die wie *LAS* zu der Familie der GRAS-Gene gehören (Llave *et al.*, 2002). Es handelt es sich um *SCL6* (*At4g00150*), *SCL22* (*At3g60630*) und *SCL27* (*At2g45160*). Die drei Gene gehören zu der Untergruppe der *HAIRY MERISTEM*-ähnlichen Gene in *A. thaliana* (Bolle, 2004; Tian *et al.*, 2004). Zu dieser Unterfamilie werden auch die zwei Gene *SCL15* (*At4g36710*) und *SCL26* (*At4g08250*) gezählt (Abb. 3-4, A; Tian *et al.*, 2004). Die drei Gene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* weisen eine höhere Ähnlichkeit zu *HAM* auf, als *SCL15* und *SCL26*. In einem Sequenzvergleich konnte außerdem gezeigt werden, dass die beiden Letzteren keine *miR171*-Zielsequenz aufweisen. *miR171* erkennt und bindet einen konservierten Bereich im offenen

Leseraster von *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* (Abb. 3-4, B). Die Bindung von *miR171* an diese Sequenz führt zu einem Abbau der Transkripte, der experimentell für die Gene *SCL6* und *SCL22* nachgewiesen wurde (Llave *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde das Verzweigungsmuster der *35S::mir171*-Linie unter zwei verschiedenen Lichtbedingungen, Lang- und Kurztag, untersucht.

Die Untersuchung des Verzweigungsmusters der *35S::mir171*-Linie erfolgte zunächst unter Langtagbedingungen. Eine Veränderung in der Sprossarchitektur im Vergleich zu Col-0-Wildtyppflanzen konnte unter diesen Wachstumsbedingungen für die *35S::mir171*-Linie bestätigt werden (Abb. 3-4, E-F). Es zeigte sich, dass eine starke Verminderung der Anlage von Seitentrieben in der vegetativen, sowie in der reproduktiven Phase auftrat. Dieser Phänotyp ähnelte dem der *eo15*-Linie bei Wachstum in kurzen Photoperioden. Im Folgenden wurden die Phänotypen der *35S::mir171*-Linie und der *eo15*-Mutante miteinander verglichen. In Kapitel 3.1 wurde beschrieben, dass der Verzweigungsdefekt der *eo15*-Linie abhängig von der Länge der Photoperiode ist und nur bei Anzucht unter kurzen Photoperioden auftritt.



Abb. 3-4 Darstellung der Sequenzverwandtschaft zwischen dem HAM-Protein aus *Petunia hybrida* und den SCL-Proteinen aus *A. thaliana*, der Zielsequenz der *miR171* und des Habitus der *35S::mir171*-Linie bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen im Vergleich zum Wildtyp. **(A)** Phylogenetischer Baum der HAM-Unterfamilie in *A. thaliana*. **(B)** Vergleich der *miR171*-Zielsequenz in den Transkripten *SCL6*, *SCL22* und *SCL27*. **(C-F)** Phänotyp der *35S::mir171*-Linie **(D, F)** im Vergleich zum Col-0-Wildtyp **(C, E)** unter Kurztagbedingungen nach 8 Wochen **(C, D)** und unter Langtagbedingungen nach 4 Wochen **(E, F)**.

Um die Phänotypen der *eo15*-Mutante und der *35S::mir171*-Linie vergleichen zu können, wurden diese unter Kurztagbedingungen parallel zu Col-0 und *las-4*-Pflanzen

angezogen. Es konnte beobachtet werden, dass nach etwa acht Wochen für die *eo15*, Col-0 und *las-4*-Pflanzen der Übergang zur reproduktiven Phase erfolgt war. Der Vergleich zu den parallel angezogenen *35S::miR171*-Pflanzen zeigte, dass der Übergang in die reproduktive Phase in diesen Pflanzen nach acht Wochen noch nicht stattgefunden hatte. Es konnte ein neuer Phänotyp beobachtet werden, obwohl erwartet wurde, dass die *35S::miR171*-Linie unter Kurztagbedingungen einen den *eo15*-Pflanzen ähnlichen Verzweigungsphänotyp ausbilden würde. Stattdessen stellten die *35S::miR171*-Pflanzen das Wachstum ein. Nach der Anlage von etwa 20-25 Blättern terminierten die Pflanzen in der vegetativen Phase. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass diese transgene Linie, neben einer Verminderung der Seitentriebeanlage in langen Photoperioden, zusätzlich eine terminale Differenzierung des Hauptmeristems in kurzen Photoperioden aufwies (Abb. 3-4, C-F).

Es stellte sich im Folgenden die Frage, ob der Verzweigungsphänotyp der *35S::mir171*-Linie in langen Photoperioden allein von der Reduktion der Transkripte der drei Zielgene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* abhängig war, oder ob möglicherweise die Verminderung der Transkripte weiterer, noch nicht identifizierter Zielgene der *miR171* für die Ausbildung des Phänotyps verantwortlich war. Möglicherweise wurde der Phänotyp der Linie im Langtag auch nicht durch den Ausfall aller drei Genprodukte ausgebildet, sondern nur durch den Verlust von einem der Zielgene. Diese Hypothesen wurden in weiteren Experimenten untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen werden in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt.

3.2.2 Identifizierung von *scl*-Insertionslinien durch *in silico*-Analyse

Die Reduktion der Anlage von Seitentrieben in der *35S::mir171*-Linie in langen Photoperioden resultierte aus der Fehlexpression von *miR171* (Kap. 3.2.1). Die Zielgene dieser microRNA sind *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* (Llave *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002). Das Ziel der folgenden Analysen war, den Genen *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* eine mögliche Funktion bei der Anlage von Seitentrieben in *A. thaliana* zuzuordnen. Es wurde ein revers gerichteter genetischer Ansatz gewählt. Nach der Identifizierung verschiedener Allele der drei Gene wurde der Ausfall der Genfunktionen auf die phänotypische Erscheinung der Pflanze analysiert.

Es wurden Funktionsverlustmutanten untersucht, um den Prozess, an dem das zu untersuchende Gen beteiligt ist, aufzudecken. Diese Art von Mutation wird häufig durch die Insertion von Transposons oder einer Transfer-DNA (T-DNA) in das pflanzliche Genom herbeigeführt. Erfolgt die Insertion des Transposons oder der T-DNA innerhalb

des kodierenden Bereichs eines Gens, führt dies in der Regel dazu, dass die Sequenz des Gens unterbrochen wird und kein oder nur ein verkürztes Transkript des Gens gebildet wird. Um den *SCL*-Genen eine Funktion bei der Regulierung der Verzweigung in *A. thaliana* zuordnen zu können, wurden verschiedene Kollektionen an Insertionsmutanten nach Integrationen von T-DNAs oder Transposons in den *SCL* Genen *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* durchsucht.

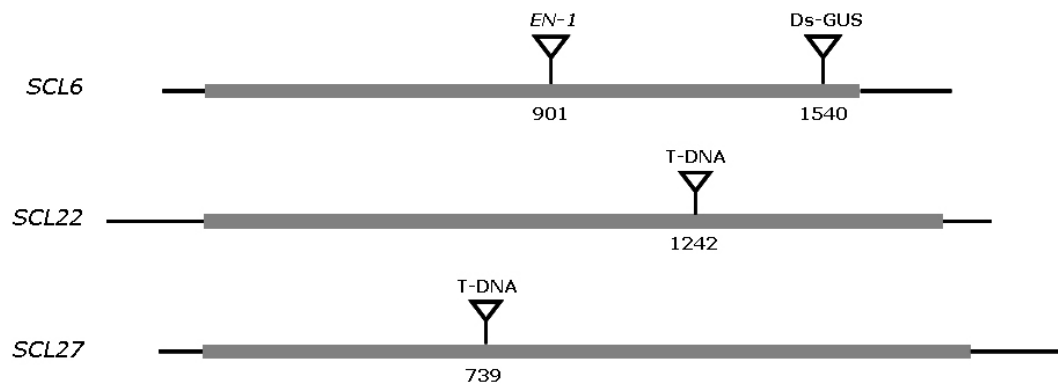


Abb. 3-5 Übersicht der verwendeten Insertionslinien. Die Positionen, an denen die T-DNA, *En-1* oder Ds-GUS-Insertionen in den kodierenden Bereich der Gene *SCL6*, *SCL22* oder *SCL27* erfolgte, sind angegeben. Die 5'- oder 3'-untranslatierten Bereiche (Striche) und die kodierenden Sequenzen (graue Balken) der drei Gene sind skizziert.

Für *SCL6* konnte eine Ds-GUS-Linie der IMA-Insertionslinien (N100299) identifiziert werden (Sundaresan *et al.*, 1995). Die Ds-GUS-Linie wurde im Ökotyp *Landsberg erecta* (*Ler*) generiert. Das Ds-GUS-Element inserierte in das offene Leseraster des Gens 1540 bp stromabwärts vom Startkodon entfernt.

Eine weitere Insertionsmutante für das Gen *SCL6* konnte aus der ZIGIA-Population (Baumann *et al.*, 1998; Wisman *et al.*, 1998), die mit dem *Enhancer-1* (*EN-1*)-Element aus Mais mutagenisiert wurde, isoliert werden. Diese Linie (7AS124) stand zu Beginn der Bearbeitung dieses Themengebiets bereits in der Arbeitsgruppe Theres zur Verfügung. Der Ort der Insertion des Transposons konnte mittels diagnostischer PCR und Sequenzanalyse verifiziert werden und lag 901 bp vom Startkodon entfernt (Abb. 3-5). Die ZIGIA-Population wurde im Ökotyp Columbia-0 (Col-0) generiert.

Eine T-DNA-Insertionslinie für das Gen *SCL22* konnte in der SALK-Kollektion (Alonso *et al.*, 2003; SALK_150134) im Ökotyp Col-0 gefunden werden. Die Insertion der T-DNA in *SCL22* wurde mittels einer Sequenzanalyse verifiziert. Die T-DNA befand sich im offenen Leseraster 1242 bp vom Startkodon entfernt (Abb. 3-5).

Für das Gen *SCL27* wurde eine T-DNA-Insertionslinie (239F03) der Versailles Kollektion isoliert (Bouchez *et al.*, 1993; Samson *et al.*, 2002). Die Insertion der T-DNA konnte ebenfalls durch eine Sequenzanalyse bestätigt werden und lag 739 bp vom Startkodon entfernt (Abb. 3-5). Die Versailles T-DNA-Insertionspopulation wurde in dem Ökotyp Wassilewskija (Ws) generiert.

Mittels semiquantitativer RT-PCR Experimente wurde gezeigt, dass in der *EN-1*- und den T-DNA-Insertionslinien die Transkriptakkumulation im Vergleich zum Wildtyp verändert war (Abb. 3-6). Für die Analyse wurden genspezifische Oligonukleotide verwendet, die die Insertionsstelle flankierten (Kap. 2.1). Mit diesen konnte aus cDNA der Insertionslinien, im Gegenteil zur parallel getesteten cDNA des Wildtyps, kein PCR-Produkt amplifiziert werden. In einer RT-PCR Analyse mit Oligonukleotiden, die vor den Insertionsstellen binden, konnte bei allen drei untersuchten Linien ein PCR-Produkt nachgewiesen werden (Kap. 2.1). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass ein Wildtyp-Transkript nicht amplifiziert werden konnte. Die bestätigten Allele wurden im Folgenden mit *scl6-1* (ZIGIA_7AS124), *scl6-2* (IMA-N10029), *scl22-1* (SALK_150134) und *scl27-1* (FLAG_239F03) bezeichnet.

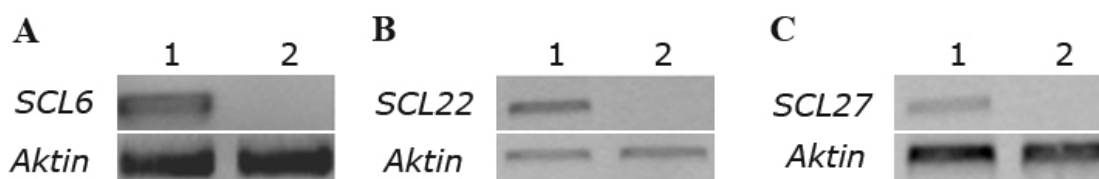


Abb. 3-6 Analyse der Genexpression in *scl*-Insertionslinien. (A-C) RT-PCR Analysen mit cDNA der Insertionsmutanten *scl6-1* (A), *scl22-1* (B) und *scl27-1* (C). Mit genspezifischen Oligonukleotiden (Kap. 2.1), die die Insertionsstelle flankierten, konnte in der cDNA der jeweiligen Insertionsmutanten (2) im Gegensatz zur Wildtyp-cDNA (1) kein Transkript nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge und ihrer Qualität wurde in Kontrollexperimenten *Aktin*-cDNA amplifiziert (29 PCR-Zyklen).

3.3. Untersuchungen zur Anlage von Seitentrieben in den *scl*-Insertionslinien bei Kultivierung in kurzer und langer Photoperiode

3.3.1 Analyse der Einzel- und Doppelmutanten

Die Analyse des Verzweigungsmusters wurde an Pflanzen der Insertionsmutanten *scl6-1*, *scl22-1* und *scl27-1*, allen möglichen Kombinationen von Doppelmutanten, sowie der Tripelmutante, die bis zur Blüte unter Kurztagbedingungen (8h Licht, 16 h Dunkelheit) oder unter Langtagbedingungen (16h Licht, 8h Dunkelheit) angezogen wurden, durchgeführt. Für Vergleiche der Phänotypen aller untersuchten Mutanten mit

denen anderer Verzweigungsmutanten (Clarenz, 2004; Müller, 2005) wurde zudem der Blühzeitpunkt ermittelt, die Länge der Infloreszenz gemessen und die Anzahl an Stängelblätter erfasst (Kap. 2.2). Für alle analysierten Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten konnte keine Abweichung in diesen Parametern im Vergleich zur korrespondierenden Wildtypkontrolle festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Ds-GUS-Insertionslinie von *SCL6* wurde in den nachfolgenden Experimenten nicht verwendet, um die Unterschiede der genetischen Hintergründe zwischen den verschiedenen Insertionslinien gering zu halten.

3.3.2 Analyse der *sc16-1* und *sc122-1*-Insertionslinie

Für die *sc16-1* und *sc122-1*-Insertionslinie wurden unter beiden Kultivierungsbedingungen, Kurztag und Langtag, keine Veränderungen in der Sprossarchitektur im Vergleich zum Col-0-Wildtyp gefunden. Sowohl *sc16-1* als auch *sc122-1*-Pflanzen wiesen eine unveränderte Anlage von Achselmeristemen in der vegetativen und der reproduktiven Phase auf.

3.3.3 Analyse der *sc127-1*-Insertionslinie

Die *sc127-1*-Insertionslinie enthält eine T-DNA in der kodierenden Sequenz des Gens (Abb. 3-5). Die Insertion wurde in den Ws Ökotyp eingeführt. Als Kontrollpflanzen wurden daher Ws-Wildtyppflanzen gewählt und diese parallel zur *sc127-1*-Insertionslinie angezogen.

Ein Vergleich der unter Kurztagbedingungen kultivierten *sc127-1*-Pflanzen mit dem Wildtyp zeigte, dass die Seitentriebbildung in *sc127-1*-Pflanzen gegenüber dem Ws-Wildtyp reduziert war (Abb. 3-7, A-D und Abb. 3-7, E). Besonders deutlich war der Verzweigungsdefekt während der vegetativen Entwicklungsphase zu erkennen. Hier fehlte in 45 Prozent der untersuchten Pflanzen ein lateraler Trieb in den jüngsten Rosettenblattachsen (Abb. 3-7, E).

Der im Kurztag auftretende Phänotyp konnte mittels der makroskopischen Analyse (Kap. 2.2) der Rosettenblattachsen charakterisiert werden. Die Analyse der vegetativen Blattachsen zeigte, dass bei den *sc127-1*-Pflanzen nicht nur in den jüngsten Rosettenblattachsen, sondern auch in Achseln älterer Rosettenblattpositionen häufig eine Bildung der Seitentriebe unterblieb (Abb. 3-7, E). Diese Beobachtungen wiesen darauf hin, dass der Verzweigungsdefekt in der *sc127-1*-Mutante in

unterschiedlich starker Ausprägung in der gesamten vegetativen Entwicklungsphase auftrat. In 26 Prozent der untersuchten Pflanzen trat dieser Verzweigungsphänotyp auch in der reproduktiven Phase auf. Die reduzierte Bildung primärer Seitentriebe konnte in neun Prozent der analysierten Stängelblattachseln detektiert werden. In solchen Pflanzen fehlten Seitentriebe meistens in den ältesten Blattachseln.

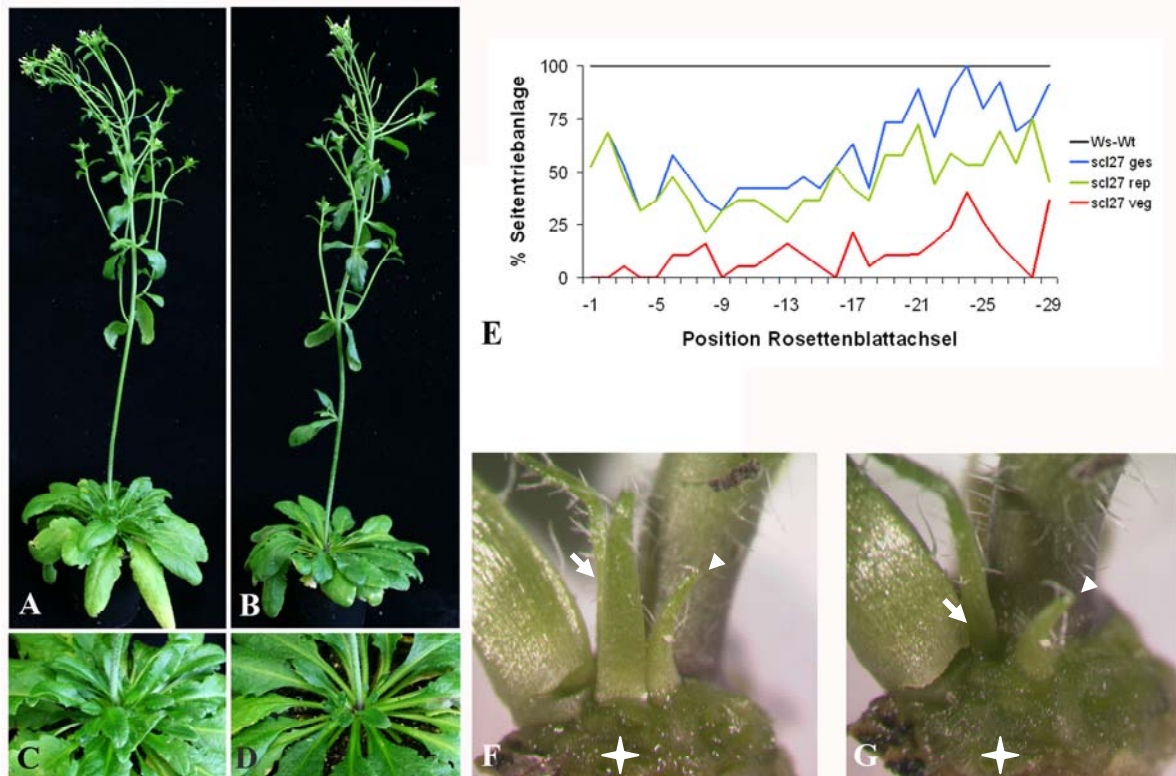


Abb. 3-7 Analyse der *scl27-1*-Mutante in kurzer Photoperiode. (A-D) Dargestellt ist der Phänotyp der *scl27-1*-Mutante (**B, D**) im Vergleich zum Ws-Wt (**A, C**). *scl27-1*-Pflanzen zeigten bei Kultivierung unter Kurztagbedingungen eine Verminderung der Seitentriebbildung innerhalb der vegetativen Wachstumsphase (**D**). (**C-D**) Nahaufnahme einer Rosette des Ws-Wt (**C**) und einer *scl27-1*-Pflanze (**D**). (**E**) Graphische Darstellung der Entwicklung von Achselknospen in der *scl27-1*-Mutante im Vergleich zum Ws-Wt während der vegetativen Phase. Im Diagramm sind die Prozentsätze angegeben, mit denen in Rosettenblattachseln Seitentriebe angelegt wurden (n=19). Es wurde zwischen Seitentrieben, die nur ein Blatt anstatt eines Triebes bildeten (*scl27* veg) und solchen, die einen reproduktiven Trieb formten (*scl27* rep) unterschieden. Die blaue Linie repräsentiert die Gesamtzahl (*scl27*-veg + *scl27*-rep) an detektierten Knospen. (**F**) Seitenansicht einer Rosettenblattachsel, in der sich zwei radiäre Blätter bildeten (Pfeil; Pfeilspitze). (**G**) Nach Entfernen eines der Blätter (linkes Blatt, Pfeil) war kein Seitentrieb zwischen den beiden Blättern erkennbar. (**F-G**) Der Stern markiert die Ansatzstelle des Rosettenblattes. Es wurde entfernt, um die Achsel freizugeben. Hinter dem rechten Achselblatt (Pfeilspitze) liegt die primäre Infloreszenz. (A-G) *scl27-1*: n= 19; Ws-Wt: n=10

Es stellte sich heraus, dass nicht nur die Anlage von Lateralmeristemen innerhalb der vegetativen und reproduktiven Phase beeinträchtigt war. Als weitere Besonderheit der

scl27-1-Mutante konnte beobachtet werden, dass in einigen Achseln anstatt primärer Seitentriebe lediglich ein oder zwei Blätter angelegt wurden. Häufig wiesen diese Blätter eine Radialisierung auf (Abb. 3-7, F-G). Die Stellung der Blätter in der Achsel ließ darauf schließen, dass das Meristem des Seitentriebs nicht aufrechterhalten werden konnte und diese Blätter die ersten vom Seitentrieb gebildeten Blätter darstellten (Abb. 3-7, F-G). Die ersten Blätter eines primären Triebs stehen sich gegenüber und werden senkrecht zur Blattachsel angelegt (Grbic und Bleecker, 2000).

Interessanterweise trat die oben beschriebene reduzierte Verzweigung der *scl27-1*-Mutante nicht auf, wenn diese unter Langtagbedingungen angezogen wurde (Daten nicht gezeigt). Eine ähnliche Abhängigkeit des Phänotyps von der Länge der Photoperiode wurde auch für die *rax*-Mutanten beschrieben (Müller *et al.*, 2006) und lässt auf einen redundanten Mechanismus der Seitentriebbildung schließen, der im Langtag aktiv ist und im Kurztag reprimiert wird.

Die Charakterisierung der drei Einzelmutanten zeigte, dass ein Verlust der Genaktivitäten von *SCL6* und *SCL22* keinen Einfluss auf die Anlage von Seitentrieben hatte. Für *SCL27* konnte allerdings eine Funktion bei der Anlage der Seitentriebe beobachtet werden. Die Insertion einer T-DNA im Gen *SCL27* führte in Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, zu einem veränderten Verzweigungsmuster. Dieser Defekt trat deutlich während der vegetativen Phase in Erscheinung. In der reproduktiven Phase kam dieser Defekt schwächer zur Ausprägung.

3.4 Untersuchungen von Doppel- und Tripelmutanten bei Kultivierung in kurzer und langer Photoperiode

Es wurden drei Doppel- und eine Tripelmutante mit den verwendeten Allelen *scl6-1*, *scl22-1* und *scl27-1* hergestellt, um Funktionen der *HAM*-homologen Gene aus *A. thaliana* aufzudecken, welche möglicherweise durch eine funktionelle Redundanz innerhalb der Gruppe verdeckt waren. Es wird angenommen, dass *A. thaliana* mindestens zwei Duplikationen des gesamten Genoms erfahren hat (Vision *et al.*, 2000). Die Gene *SCL22* und *SCL27* sind aus einer rezenter segmentalen Duplikation von Chromosom 2 und Chromosom 3 hervorgegangen (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Bolle, 2004). Beide Proteine wiesen in einem phylogenetischen Baum (Abb. 3-4) eine hohe Homologie zueinander auf. Die Homologien zwischen den Proteinen *SCL6* und *SCL22* und zwischen *SCL6* und *SCL27* waren geringer. Die relativ hohe Übereinstimmung auf der Aminosäureebene zwischen *SCL22* und *SCL27* führte zu der Annahme, dass die beiden Proteine möglicherweise ähnliche Prozesse innerhalb der

Pflanzenentwicklung beeinflussen. Um eine mögliche funktionelle Redundanz zwischen den beiden Genen zu ermitteln, wurden Doppelmutanten zwischen den beiden Allelen *scl22-1* und *scl27-1* erzeugt. Die *scl6-1 scl22-1* und *scl6-1 scl27-1*-Doppelmutanten wurden aus einer Kreuzung der *scl22-1 scl27-1*-Doppelmutante zur *scl6-1*-Mutante isoliert. In der segregierenden F2-Population konnten homozygote *scl6-1 scl22-1* und *scl6-1 scl27-1*-Doppelmutanten mittels PCR identifiziert werden.

Die Doppelmutanten *scl6-1 scl22-1*, *scl6-1 scl27-1* und *scl22-1 scl27-1* wiesen einen gemischten Hintergrund zwischen den Ökotypen Col-0 und Ws auf. Aus der segregierenden F2-Population der Kreuzungen von *scl22-1* x *scl27-1* und der Kreuzung einer *scl22-1 scl27-1*-Pflanze mit der Einzelmutante *scl6-1* wurden daher als Wildtyp-Kontrollen Pflanzen gewählt, die in keinem der Gene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* eine T-DNA- bzw. *EN-1* Insertion aufwiesen. Nachkommen dieser Pflanzen wurden parallel zu den Doppelmutanten *scl6-1 scl22-1*, *scl6-1 scl27-1* und *scl22-1 scl27-1* kultiviert.

3.4.1 Analyse der *scl6-1 scl22-1*-Doppelmutante bei Kultivierung in kurzer und langer Photoperiode

Ähnlich wie für die *scl6-1* und *scl22-1*-Einzelmutanten, wurde auch für die Doppelmutante *scl6-1 scl22-1* keine Veränderung im Verzweigungsmuster sowohl in langen, als auch in kurzen Photoperioden festgestellt. Die Anlage von Seitentrieben in der vegetativen Phase der *scl6-1 scl22-1*-Pflanzen wurde in der makroskopischen Analyse bestätigt. Die Analyse zeigte, dass keine Abweichung vom Wildtyp bestand (Daten nicht gezeigt).

Auch während der reproduktiven Phase trat keine Veränderung des Verzweigungsmusters auf. Abweichungen beim Blühzeitpunkt der Doppelmutante vom parallel kultivierten Wildtyp waren nicht zu beobachten. Die Untersuchungen zeigten, dass in der Doppelmutante von *scl6-1* und *scl22-1* der Phänotyp der *35S::mir171*-Pflanzen bezüglich der Sprossarchitektur nicht auftrat.

3.4.2 Analyse der *scl6-1 scl27-1*-Doppelmutante bei Kultivierung in kurzer und langer Photoperiode

Es zeigte sich, dass die *scl6-1 scl27-1*-Pflanzen in langen Photoperioden keine Veränderungen der Sprossarchitektur im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchungen zu Veränderungen des Verzweigungsmusters der *scl6-1*

scl27-1-Pflanzen unter Kurztagbedingungen hingegen zeigten, dass im Vergleich zu Kontrollpflanzen in der Doppelmutante eine starke Reduktion der Seitentriebbildung während der vegetativen Entwicklungsphase auftrat (Abb. 3-8, A-G). Dieser Defekt wurde besonders in älteren Rosettenblattachsen beobachtet. In jüngeren Blattachsen war diese Reduktion bei der Anlage von Seitentrieben schwächer ausgeprägt. Diese Beobachtung ließ auf einen basipetalen Gradienten der Unterdrückung der Seitentriebbildung in der vegetativen Phase schließen. Besonders auffallend war, dass in vielen Blattachsen der Meristemerhalt und in einigen Fällen auch die Meristemidentität verändert war.

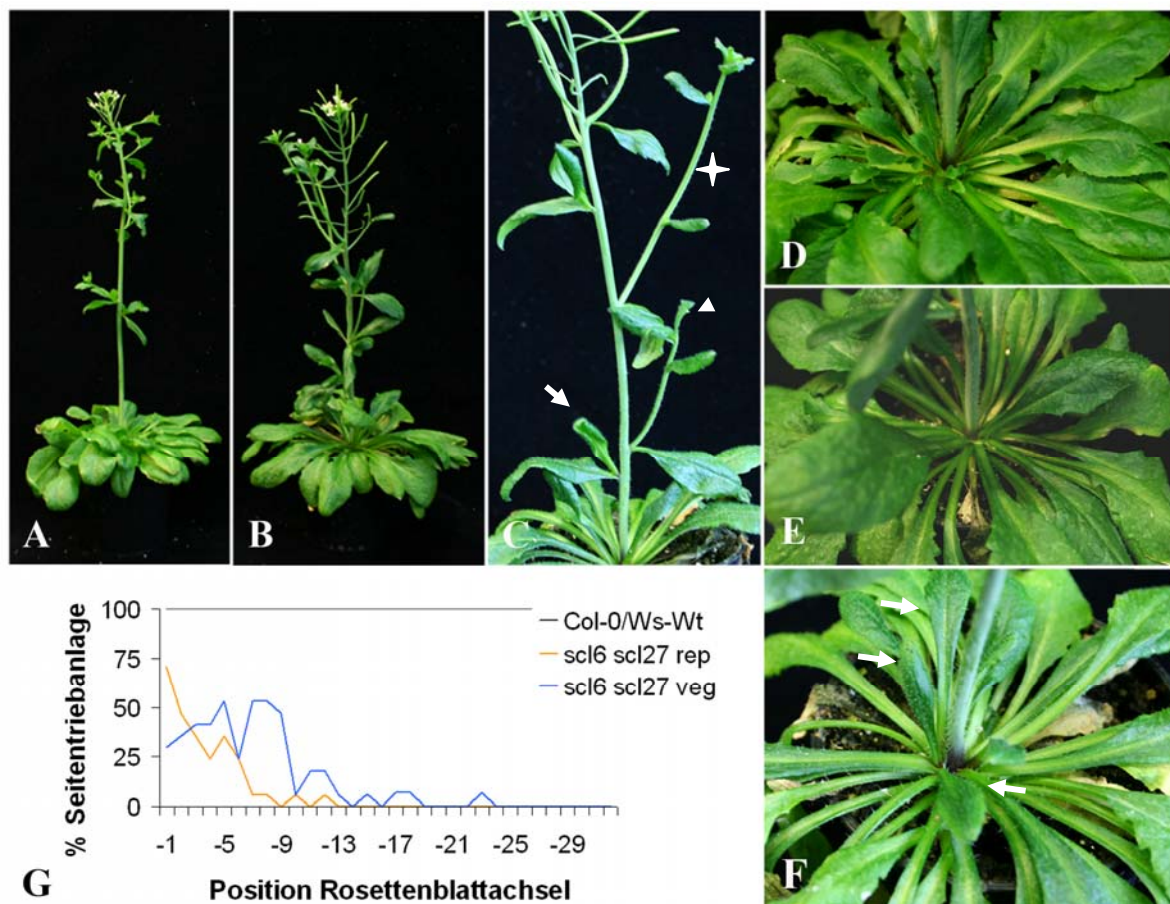


Abb. 3-8 Phänotyp der *scl6-1 scl27-1*-Doppelmutante bei Kultivierung in kurzen Photoperioden. (A-B) Habitus einer Col-0/Ws-Kontrollpflanze (A) im Vergleich zum Habitus einer *scl6-1 scl27-1*-Pflanze (B). (C) Die *scl6-1 scl27-1*-Pflanze wies einen Gradienten unterschiedlicher Meristemidentitäten in der reproduktiven Phase auf. (D-F) Vergleich einer Col-0/Ws-Wt-Rosette (D) mit *scl6-1 scl27-1*-Rosetten (E und F). (F) In den Achseln der obersten Rosettenblätter wurde statt eines sekundären Triebes ein Blatt gebildet. (G) Das Diagramm zeigt den Prozentsatz an Pflanzen an, die in einer bestimmten Achselposition einen Seitentrieb (rep) oder ein Blatt (veg) bildeten. (C: Der Pfeil markiert ein Blatt in der Achsel des untersten Stängelblattes, die Pfeilspitze markiert einen terminierten Seitentrieb und der Stern einen reproduktiven Seitentrieb; G: *scl6-1 scl27-1* n=17; Col-0/Ws-Wt n=19; F: Die Pfeile markieren Blätter in den Achseln der Rosettenblätter).

Dieser Defekt, der ähnlich auch für die *sc127-1*-Einzelmutante beobachtet wurde (Kap. 3.3.3), konnte in einer detaillierten Untersuchung der Rosettenblattachsen der Doppelmutanten näher beschrieben werden (Abb. 3-8, G).

Für viele der untersuchten Rosettenblattachsen konnte die Anlage eines sekundären Triebes nur vermutet werden. In solchen Achseln wurden ein oder zwei Blätter gefunden, die auf Grund ihrer Orientierung in der Achsel als die ersten Blätter des sekundären Triebes angesehen wurden (Abb. 3-8, F; Kap. 3.3.3). Der Seitentrieb war in diesen Achseln nicht erkennbar. Zusätzlich zeigten diese Blätter häufig eine Radialisierung. Dieses Merkmal konnte auch in der *sc127-1*-Einzelmutante beobachtet werden (Kap. 3.3.3).

In den *sc16-1 sc127-1*-Doppelmutanten trat die Reduktion der Verzweigung in der reproduktiven Entwicklungsphase nur in wenigen Fällen auf. Für einige Pflanzen der Doppelmutante konnte aber eine Änderung der Achselmeristemidentität in der reproduktiven Phase festgestellt werden. So entwickelten sich in den Stängelblattachsen dieser Pflanzen keine Seitentriebe, sondern die angelegten lateralen Triebe terminierten nach der Bildung einiger Blättern. Die Änderung der Meristemidentität in den Achseln verlief graduell. Die Anlage sekundärer Triebe fehlte teilweise in den ältesten Stängelblattachsen, in nächst jüngeren Achseln war die Anlage von Blättern (Abb. 3-8, C, Pfeil) oder terminierter Seitentrieben zu erkennen (Abb. 3-8, C, Pfeilspitze). In den jüngsten Achseln konnten reproduktive Seitentriebe erkannt werden (Abb. 3-8, C, Stern).

Die Untersuchungen zeigten, dass eine T-DNA-Insertion im offenen Leseraster von *SCL6* verstärkend auf den *sc127-1*-Verzweigungsdefekt wirkte. Diese Verstärkung trat allerdings nur in kurzen Photoperioden in Erscheinung und betraf neben der vegetativen Entwicklungsphase auch die reproduktive Phase, in der eine Änderung der Meristemidentität in lateralen Trieben beobachtet wurde.

3.4.3 Phänotypische Charakterisierung der Doppelmutante *sc122-1 sc127-1* bei Kultivierung in langen Photoperioden

Die Analyse der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante im Langtag deckte eine partielle Überschneidung der Funktion von *SCL22* und *SCL27* in der Anlage von Seitentrieben auf. Es zeigte sich, dass 55 Prozent der untersuchten *sc122-1 sc127-1*-Pflanzen keine sekundären Triebe in den Achseln der Stängelblätter ausbildeten (Abb. 3-9, A, G-H). Der Phänotyp der *sc122-1 sc127-1*-Mutante in langen Photoperioden ähnelte dem der

35S::miR171-Linie unter Langtagbedingungen (Abb. 3-4). Weitere Auffälligkeiten in der Wuchsform der Doppelmutante zeigten sich, im Vergleich zum Wildtyp, in der Anordnung der Blüten und der Blätter am Stamm (Abb. 3-9, D-E, I-J). In 32 Prozent der untersuchten Pflanzen wurde eine veränderte Blüten-Phyllotaxis gefunden. Diese waren direkt untereinander an der gleichen Seite der primären Infloreszenz angelegt worden (Abb. 3-9, D-E). Dabei wurde häufig die untere Schote nicht vollständig ausgebildet. Eine Fehlstellung der Stängelblätter konnte in 38 Prozent der untersuchten Pflanzen festgestellt werden. Die Stängelblätter wiesen eine wirtelige Anordnung am Haupttrieb auf. Diese Wirtel setzten sich oft aus zwei bis drei Blättern zusammen (Abb. 3-9, A, H-I).

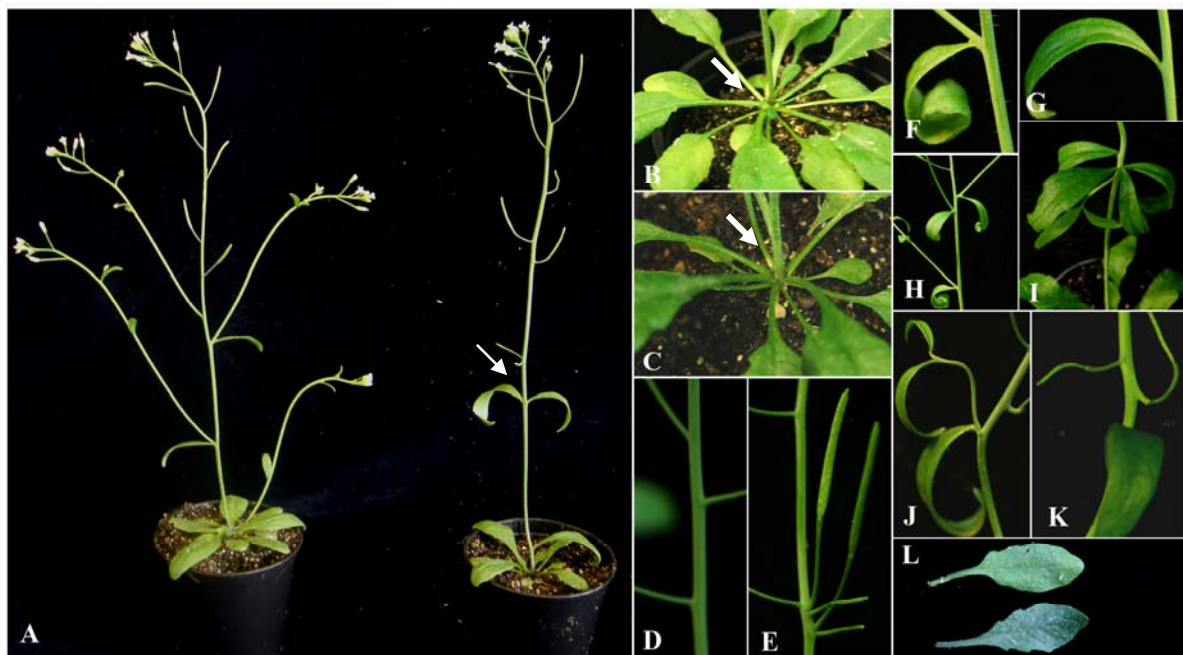


Abb. 3-9 Verminderte Seitentriebentwicklung in den Blattachsen der *scl22-1 scl27-1*-Doppelmutante. (A) Habitus der Doppelmutante *scl22-1 scl27-1*. Die *scl22-1 scl27-1*-Doppelmutante (rechts) wurde parallel mit einer Col-0/Ws-Wt-Pflanze (links) unter Langtagbedingungen angezogen. Seitentriebe wurden in allen Blattachsen des Wildtyps gebildet, während dieser Prozess in den *scl22-1 scl27-1*-Pflanzen vermindert war. (B-C) Wildtyp Rosettenblattachsen (B) im Vergleich zur *scl22-1 scl27-1*-Mutante (C). (D-E) Die Anordnung der Blüten an der primären Infloreszenz war im Vergleich zum Wildtyp (D) in der Mutante (E) verändert (32 Prozent). (F-G) Im Gegensatz zum Wildtyp (F) unterblieb in 55 Prozent der untersuchten Stängelblattachsen die Anlage eines Seitentriebs in der Mutante (G). (H-I) 38 Prozent der analysierten *scl22-1 scl27-1*-Pflanzen (I) wiesen parallel zur Fehlstellung der Blüten außerdem eine vom Wildtyp (H) abweichende Blattstellung auf. (J) Fünf Prozent der untersuchten *scl22-1 scl27-1*-Pflanzen zeichneten sich durch einen terminierten Seitentrieb in Stängelblattachsen aus. (K) Für 43 Prozent der *scl22-1 scl27-1*-Pflanzen wurde ein basal orientierter Ansatzpunkt der Blüten gefunden. In (L) ist die veränderte Rosettenblattform der Doppelmutante (unten) im Vergleich zum Wildtyp (oben) dargestellt. (A-K: n=53).

In der *sc122-1 sc127-1*-Mutante war, ähnlich der *sc16-1 sc127-1*-Doppelmutante, die Meristemidentität in den Achseln der Stängel- und Rosettenblätter (s. u.) verändert. So wurde in fünf Prozent der Achseln ein terminierter Seitentrieb, in 30 Prozent ein Blatt statt eines Seitentriebs und in neun Prozent eine einzelne Blüte angelegt. Die frühzeitige Termination des Seitentriebs deutete darauf hin, dass das Meristem nicht aufrechterhalten werden konnte.

Die lateralen Triebe, die in Rosettenblattachseln der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante gebildet wurden, wiesen ebenfalls eine divergente Meristemidentität auf. Durch die makroskopische Analyse der Rosettenblattachseln konnte gezeigt werden, dass in vier Prozent der untersuchten Achseln ein Seitentrieb, in sechs Prozent ein Blatt oder in fünf Prozent eine Aufwölbung gebildet wurde (Abb. 3-10, A-B). Diese Aufwölbung wird im Folgenden Meristemdom (MD) (Abb. 3-10, B) genannt und in Kapitel 3.10 im Detail beschrieben.

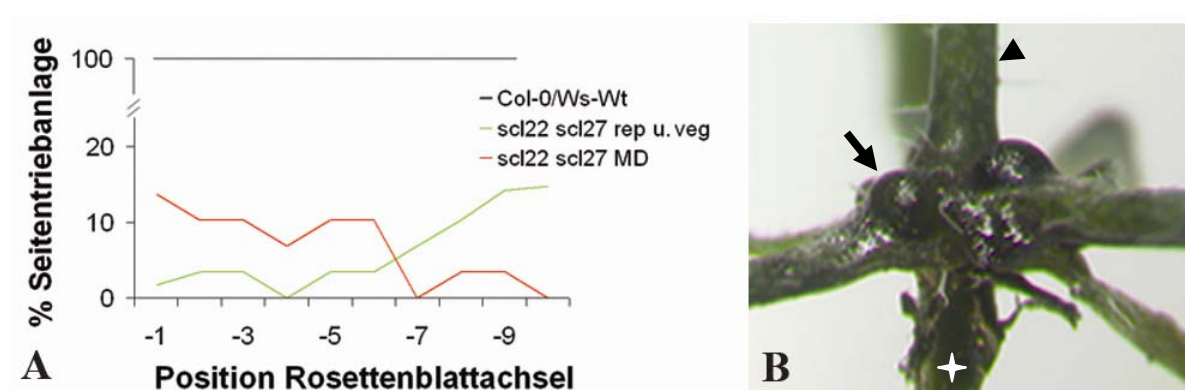


Abb. 3-10 Phänotyp der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante in langen Photoperioden. (A) Graphische Darstellung des Verzweigungsmusters von *sc122-1 sc127-1*-Pflanzen im Vergleich zum Col-0/Ws-Wt. In den Achseln der *sc122-1 sc127-1*-Mutante konnte zwischen Seitentriebeanlagen, die statt eines sekundären Triebs nur ein Blatt bildeten, einen Seitentrieb formten und Strukturen, die Meristemdom genannt wurden, unterschieden werden. Die Datensätze über die Position von Seitentrieben (rep) und Blättern (veg) in der Rosettenblattachsel wurden zusammengefasst und in einer Kurve dargestellt (rep u. veg). Die Position der Meristemdome entlang der vegetativen Achse wird durch die rote Linie repräsentiert (MD). **(B)** Seitenansicht einer *sc122-1 sc127-1*-Rosette. In den Achseln (Pfeil) der Rosettenblätter bildeten sich etwa 14 Tage nach Anthese die Meristemdome. Die Pfeilspitze weist auf den primären Trieb und der Stern markiert die Wurzel. (A: *sc122-1 sc127-1* n=29; Col-0/Ws-Wt n=10).

Die vegetativen Strukturen stellten die ersten Blätter des Seitentriebs dar, der in der Blattachsel nicht mehr zu erkennen war. Die Blätter in den Achseln wiesen häufig, wie für die *sc127-1* und *sc16-1 sc127-1*-Pflanzen bereits beschrieben (Kap. 3.3.3 und 3.4.2), eine Radialisierung auf. Die vorhandenen Seitentriebe entwickelten sich normal und bildeten Blüten aus. Eine Anlage von tertiären Trieben konnte in diesen aber nicht detektiert werden.

Als weitere Besonderheiten des *scl22-1 scl27-1*-Phänotyps konnten eine veränderte Form der Rosettenblätter festgestellt werden. Im Vergleich zu Blättern des Wildtyps waren Blätter der *scl22-1 scl27-1*-Mutante schmaler, länglicher und von dunklerem Grün (Abb. 3-9, L). Zusätzlich waren die Blätter weniger biegsam als Col-0/Ws-Blätter und brachen leicht.

In 43 Prozent der analysierten Pflanzen wurde eine Fehlorientierung des Ansatzpunkts der Blüten am Haupttrieb gefunden (Abb. 3-9, K). Dieser schien basal orientiert zu sein und der Winkel der Schote zum Haupttrieb somit vermindert. Häufig war nur die älteste Blüte besonders betroffen und die nachfolgenden Blüten zeigten eine wesentlich mildere Ausprägung dieser Fehlorientierung.

3.4.4 Analyse der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante bei Kultivierung in langen Photoperioden

Der Habitus der Tripelmutante ähnelte dem der *scl22-1 scl27-1*-Doppelmutante und der *35S::miR171*-Linie (Abb. 3-11, A). Im Unterschied zur *scl22-1 scl27-1*-Mutante wurden in der Tripelmutante aber lediglich in 12 Prozent der untersuchten Pflanzen Seitentriebe in Stängelblattachseln angelegt. Auch diese lateralen Triebe zeichneten sich durch eine veränderte Meristemidentität aus. In allen angelegten sekundären Trieben trat eine frühzeitige Beendigung des Wachstums auf und ein Infloreszenzmeristem wurde nicht gebildet.

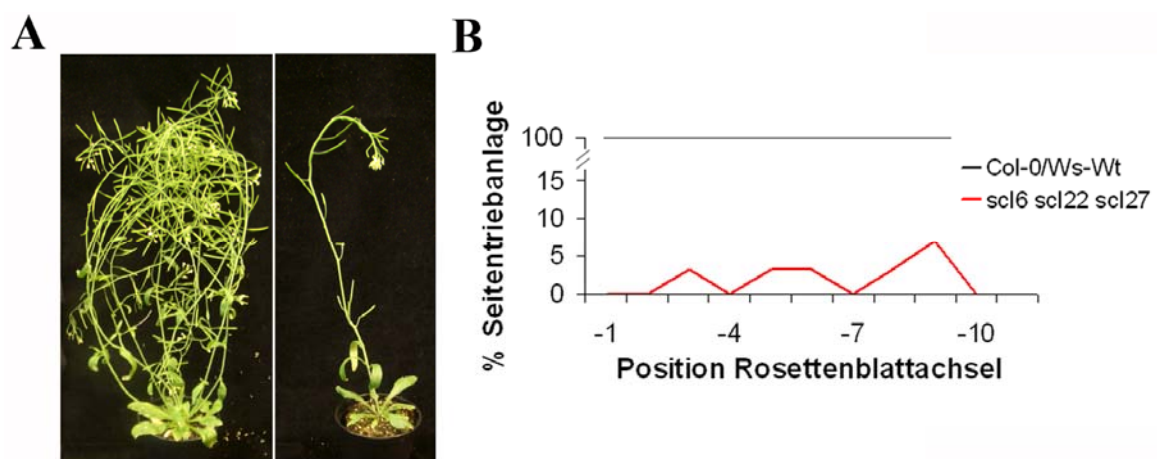


Abb. 3-11 Phänotyp der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante in langen Photoperioden. (A) Habitus einer *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanze (rechts) im Vergleich zum Col-0/Ws-Wt (links). (B) Das Diagramm repräsentiert das Verzweigungsmuster der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen im Vergleich zum Col-0/Ws-Wt. Angegeben ist der Prozentsatz an Pflanzen, die in einer bestimmten Achselposition einen Seitentrieb (Col-0/Ws-Wt: schwarze Kurve) oder einen Meristemdom (*scl6-1 scl22-1 scl27-1*: rote Linie) bildeten. (B: *scl6-1 scl22-1 scl27-1* n=31; Col-0/Ws-Wt n=10).

Anders als in der Doppelmutante konnte in Stängelblattachsen der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutante die Anlage von Blättern statt sekundärer Triebe nicht beobachtet werden.

Die makroskopische Untersuchung der Rosettenblattachsen zeigte, dass sich in zwei Prozent der Achseln Meristemdomen bildeten (Abb. 3-11, B). Diese entwickelten sich in älteren Rosettenblattachsen häufiger als in jüngeren. In etwa 20 Prozent der untersuchten Pflanzen bildete sich in den ältesten Rosettenblattachsen ein sekundärer Trieb. Diese sekundären Triebe bildeten Blüten, wiesen aber keine Anlage von Seitentrieben auf.

3.4.5 Analyse der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen bei Kultivierung in kurzen Photoperioden

Der am Anfang beschriebene Terminationsphänotyp der *35S::miR171*-Linie (Kap. 3.2.1) trat weder in der Doppelmutante *scl6-1 scl22-1*, noch der Doppelmutante *scl6-1 scl27-1* in kurzen oder langen Photoperioden in Erscheinung. Es wurde untersucht, ob dieser Phänotyp, wie der Verzweigungsphänotyp der *35S::miR171* und *scl22-1 scl27-1*-Linien unter Langtagbedingungen (Abb. 3-4, F; Abb. 3-9, A), nur in Kombination der zwei Allele *scl22-1* und *scl27-1* im Kurztag auftrat. In diesem Experiment wurden homozygote *scl22-1 scl27-1*-Pflanzen parallel zu einem Col-0/Ws-Wt für acht Wochen in kurzen Photoperioden angezogen. Dieses Experiment wurde ebenfalls für die *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante durchgeführt und die Ergebnisse beider Experimente werden im Folgenden zusammenfassend vorgestellt.

Es wurde beobachtet, dass die Anzucht der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen unter Kurztagbedingungen zu einer Termination des Hauptmeristems führte. Das Wachstum der Doppel- und Tripelmutanten blieb dabei nach der Bildung von etwa 22,5 (\pm 3,2) Rosettenblättern stehen (Abb. 3-12, C-D). Im Gegensatz dazu bildete der parallel kultivierte Wildtyp nach acht Wochen im Kurztag 38,2 (\pm 4,6) Rosettenblätter (Abb. 3-12, A-B). Das jüngste Blatt der Rosette der Pflanzen *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1* wies häufig eine Radialisierung auf (Abb. 3-12, F). In 23 Prozent der untersuchten Doppel- und Tripelmutanten wurde eine solche radiäre Struktur gefunden. Außerdem wurde in 13 Prozent der Pflanzen eine nadelförmige Struktur im Zentrum des Apex erfasst (Abb. 3-12, E), die möglicherweise einen terminierten Hauttrieb darstellte.

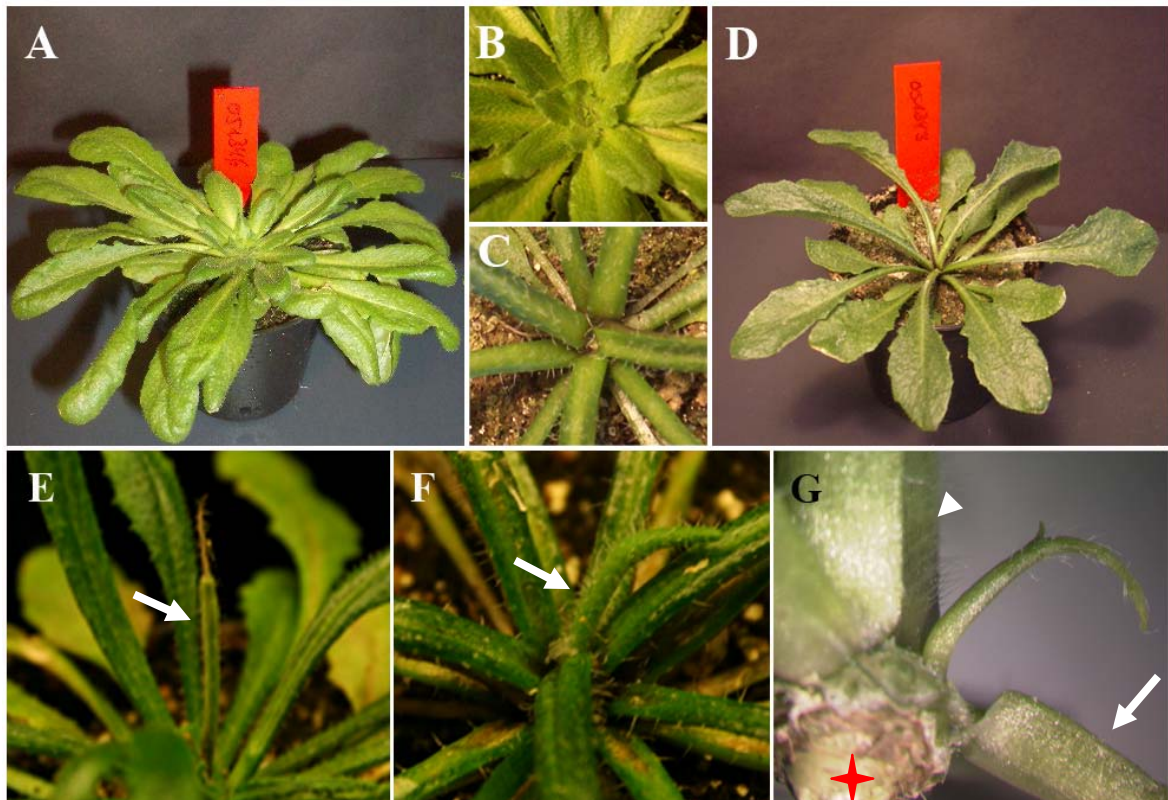


Abb. 3-12 Phänotyp der *scI22-1 scI27-1*-Pflanzen in kurzen Photoperioden. (A-D) Col-0-Wildtyp-Pflanzen (**A, B**) im Vergleich zur *scI22-1 scI27-1*-Mutante (**C, D**). Die Pflanzen wurden für 8 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen. Der Wildtyp initiierte auch nach 8 Wochen im Kurztag noch Blätter. Die *scI22-1 scI27-1*-Doppelmutante stellte nach der Bildung von 20-25 Rosettenblättern das Wachstum ein. (**B-C**) Vergleich der Anordnung der Blätter im Zentrum der Rosette zwischen dem Wildtypen (**B**) und der Doppelmutante (**C**). In (**E**) und (**F**) sind exemplarisch zwei Pflanzen abgebildet, die im Zentrum der Rosette eine nadelförmige Struktur (**E**) oder ein radialisiertes Blatt (**F**) formten. In (**G**) ist ein radialisiertes Blatt in einer Rosettenblattachsel dargestellt. Der Pfeil deutet auf das zum radialisierten Blatt zugehörige Rosettenblatt. In 5 Prozent der Rosettenblattachsen der *scI22-1 scI27-1*-Pflanzen bildete sich ein einzelnes Blatt. (E: der Pfeil markiert die nadelförmige Struktur, F: der Pfeil markiert das radialisierte Blatt; G: der Stern markiert den Ansatzpunkt der Wurzel, der Pfeil kennzeichnet das zum Achselblatt zugehörige Rosettenblatt und die Pfeilspitze das nächst jüngere Rosettenblatt).

Eine makroskopische Untersuchung der Rosettenblattachsen der *scI22-1 scI27-1* und *scI6-1 scI22-1 scI27-1*-Mutanten zeigte, dass auch unter Kurztagbedingungen die meisten Blattachsen keinen sekundären Trieb bildeten. Außerdem trat ebenfalls eine Veränderung der Identität der Lateralmeristeme auf. Im Durchschnitt bildete sich lediglich in 0,3 Prozent der untersuchten *scI22-1 scI27-1*-Rosettenblattachsen ein sekundärer Trieb. In fünf Prozent der Achseln bildete sich als vegetative Struktur ein Blatt (Abb. 3-12, G und Abb. 3-13, A). Die Untersuchung der Rosettenblattachsen der *scI6-1 scI22-1 scI27-1*-Pflanzen im Kurztag zeigte, dass die Tripelmutante im Kurztag ebenfalls die in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Meristemdome (MD) bildete (Abb. 3-13, B).

Im Durchschnitt wurde in 14,5 Prozent der Achseln ein MD gefunden. Wie für die *scI22-1 scI27-1*-Mutante beschrieben, konnte auch für die Tripelmutante die Anlage von Seitentrieben und Blättern unterschieden werden. Die Pflanzen bildeten in 3,3 Prozent aller untersuchten Achseln einen Seitentrieb. In 4,7 Prozent der Achseln wurden entweder nur ein oder zwei Blätter an Stelle eines Seitentriebs detektiert.

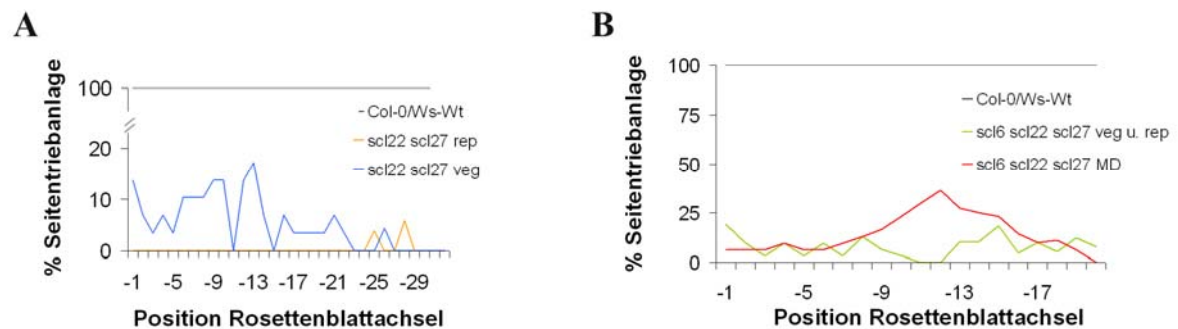


Abb. 3-13 Graphische Darstellung des Verzweigungsmusters in Rosettenblattachsen von *scI22-1 scI27-1* und *scI6-1 scI22-1 scI27-1*-Pflanzen unter Kurztagbedingungen. In **(A)** ist der Prozentsatz an *scI22-1 scI27-1*-Pflanzen angegeben, in denen an einer bestimmten Achselposition ein Seitentrieb (*scI22 scI27 rep*) oder ein vegetatives Organ (*scI22 scI27 veg*) angelegt wurde. **(B)** Das Diagramm zeigt den Prozentsatz an *scI6-1 scI22-1 scI27-1*-Pflanzen an, bei denen an einer bestimmten Position entlang der vegetativen Achse entweder ein vegetatives Organ, ein Seitentrieb oder aber ein Meristemdom (*scI6 scI22 scI27 MD*) angelegt wurde. Zur Übersicht wurden die Werte für die Anzahl vegetativer und reproduktiver Strukturen in einer gemeinsamen Kurve zusammengefasst (*scI6 scI22 scI27 veg u. rep*). (A: *scI22-1 scI27-1* n=29; Col-0/Ws-Wt n=19, B: *scI6-1 scI22-1 scI27-1* n=31; Col-0/Ws-Wt n=19).

3.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der Einzel- und Doppelmutanten und der Tripelmutante

Die Analysen der Einzel- und Doppelmutanten, sowie der Tripelmutante der drei *HAM*-ähnlichen Gene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* zeigten, dass die drei Gene in unterschiedlichem Maße an der Anlage von Seitentrieben beteiligt sind. So konnte für die *scI27-1*-Einzelmutante bei Kultivierung unter Kurztagbedingungen eine Reduktion der Seitentriebabildung während der vegetativen Phase der Entwicklung beobachtet werden. Eine Funktion bei der Anlage lateraler Triebe konnte für *SCL6* und *SCL22* erst bei einer Kombination der mutierten Allele mit der *scI27-1*-Mutante aufgedeckt werden. Das *scI6-1*-Allel verstärkte den Verzweigungsdefekt der *scI27-1*-Mutante unter Kurztagbedingungen. Eine Kombination zwischen den Allelen *scI22-1* und *scI27-1* zeigte eine Phänokopie des Verzweigungsmusters der *35S::mir171*-Linie in langen und kurzen Photoperioden. *scI6-1* verstärkte den Phänotyp der *scI22-1 scI27-1*-Doppelmutante in der vegetativen und reproduktiven Phase unter Langtagbedingungen.

3.5. Untersuchungen zur Termination des Hauptmeristems

3.5.1 Untersuchungen zum Einfluss der Länge der Photoperiode auf den Erhalt des Hauptmeristems in der *scl22-1 scl27-1*-Doppelmutante und der Tripelmutante

Im folgenden Experiment sollte die Ursache für die Termination der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen im Kurztag näher untersucht werden. Ein Experiment, welches für die *35S::miR171*-Linie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, zeigte, dass durch eine Stimulation der Blühinduktion im Kurztag der Terminationsphänotyp aufgehoben werden konnte. In diesem Experiment wurden *35S::miR171*-Pflanzen kontinuierlich für acht Wochen in kurzen Photoperioden kultiviert. Ein Teil der *35S::miR171*-Pflanzen wurde zweimal pro Woche mit einer Lösung bioaktiven Gibberellins (GA_{4+7} ; 0,1 mM) behandelt. Der andere Teil der *35S::miR171*-Pflanzen diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Gibberellin ist ein Phytohormon, das als Wachstumsregulator wirkt. Neben entwicklungsphysiologischen Prozessen, wie die der Samenreifung und des Zellstreckungswachstums (Fleet und Sun, 2005), hat GA auch einen wesentlichen Einfluss auf den Zeitpunkt der Blütenbildung (Zeevaart, 1983). So unterbleibt in der GA-Biosynthese-Mutante *ga1-3* der Übergang zur reproduktiven Phase unter Kurztagbedingungen (Wilson, Heckmann und Somerville, 1992).

Es stellte sich heraus, dass etwa ein Viertel der mit GA behandelten *35S::miR171*-Pflanzen einen primären Trieb und Blüten bildeten. In den unbehandelten Kontrollpflanzen war diese Entwicklung nicht zu beobachten und es zeigte sich der erwartete Terminationsphänotyp. Diese Ergebnisse waren Anlass für ein Experiment, in dem der Zeitpunkt der Blühinduktion auf den Erhalt der meristematischen Identität in *scl22-1 scl27-1*-Doppelmutanten und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutanten genauer untersucht werden sollte. Die Pflanzen wurden parallel mit einem Col-0/Ws-Wt für unterschiedlich lange Zeiträume in kurzen Photoperioden kultiviert und anschließend in Langtagbedingungen überführt.

Es zeigte sich, dass die Termination der Doppel- und Tripelmutanten verhindert werden konnte, wenn die Mutanten nur für eine kürzere Periode den restriktiven Wachstumsbedingungen im Kurztag ausgesetzt wurden. Nach Anzucht von 32 Tagen unter Kurztagbedingungen konnten alle Pflanzen, die anschließend in langen Photoperioden kultiviert wurden, eine Hauptinfloreszenz formen und blühen (Abb. 3-14, A). Die Anzahl gebildeter Blüten bis zum Zeitpunkt der Seneszenz der primären Infloreszenz sollte Auskunft darüber geben, ob die primäre Infloreszenz der Doppel-

und Tripelmutante im Vergleich zum Wildtyp terminierte und eine Reduktion der Blütenanzahl aufwies. Es zeigte sich, dass die Doppel- und Tripelmutanten nach 32 Tagen Anzucht in kurzen Photoperioden bei anschließender Kultivierung unter Langtagbedingungen im Durchschnitt 85 Blüten bildeten. Pflanzen des parallel kultivierten Wildtyps bildeten zu allen untersuchten Zeitpunkten im Durchschnitt 87 Blüten.

Je länger die Periode des Wachstums unter Kurztagbedingungen andauerte, desto stärker trat eine Termination des Meristems für die Doppel- und Tripelmutante auch unter anschließenden Langtagbedingungen auf. Bereits nach 41 Tagen in kurzen Photoperioden stellten über 85 Prozent der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen das Wachstum während der vegetativen Entwicklung ein (Abb. 3-14, A-B). Die restlichen 14 Prozent bildeten eine primäre Infloreszenz und im Durchschnitt 50 Blüten. Für die *scl22-1 scl27-1*-Mutante wurde zum selben Zeitpunkt des Transfers vom Kurztag in Langtagbedingungen die Beobachtung gemacht, dass der Prozentsatz an Pflanzen, die noch einen Haupttrieb mit durchschnittlich 62 Blüten bildeten, bei 41 Prozent lag (Abb. 3-14, A).

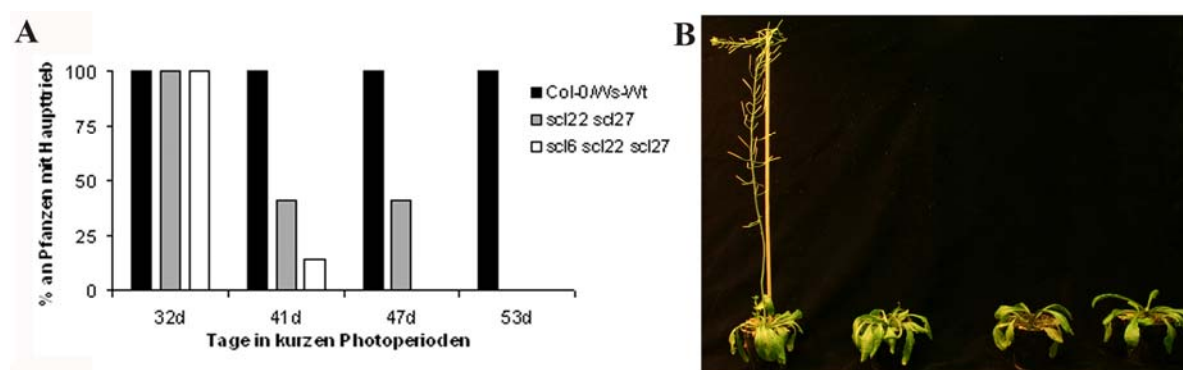


Abb. 3-14 Untersuchungen zum Einfluss der Länge der Photoperiode auf den Phänotyp der *scl22-1 scl27-1* oder *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten. (A) *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen wurden für 32, 42, 47 oder 53 Tage in kurzen Photoperioden kultiviert und anschließend in lange Photoperioden transferiert. Die Grafik stellt den Prozentsatz an Pflanzen dar, die nach 32, 41, 47 oder 53 Tagen Kurztag, bei anschließender Kultivierung unter Langtagbedingungen noch einen Blüten bildenden Haupttrieb formten. **(B)** Phänotyp von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen die 32, 41, 47 oder 53 Tage unter kurzen Photoperioden angezogen und anschließend im Langtag bis zur Blüte der Referenzpflanzen (Col-0/Ws-Wt) weiterkultiviert wurden (32, 41, 47, 53 Tage Kurztag; von links nach rechts). **(A)** Für alle Zeitpunkte (32, 41, 47 und 53 Tage) wurden jeweils 7 Pflanzen der drei Genotypen untersucht.

Für die Doppelmutante wurde auch nach 47 Tagen Kultivierung unter Kurztagbedingungen ein vergleichbarer Prozentsatz an Pflanzen gefunden, die nach dem Transfer in Langtagbedingungen einen primären Trieb mit etwa 60 Blüten bildeten.

Die *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Mutante dagegen wies für alle zu diesem Zeitpunkt analysierten Pflanzen eine Termination im Wachstum auf. Nach einer Zeitspanne von 53 Tagen in kurzen Photoperioden und anschließendem Transfer zu Langtagbedingungen ging die Kompetenz der Doppel- und Tripelmutanten, das Meristem zu erhalten, verloren und eine Termination des Meristems konnte nicht mehr verhindert werden. Alle parallel kultivierten Kontrollpflanzen, die nach 32, 41, 47 oder 53 Tagen vom Kurztag in Langtagbedingungen überführt wurden, bildeten einen primären Infloreszenztrieb.

Die Ermittlung der Anzahl sichtbarer Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Überführung der Pflanzen vom Kurztag in den Langtag sollte darüber Auskunft geben, ob bei den Mutanten bereits zu den jeweils gewählten Zeitpunkten ein Unterschied in der Entwicklung zum Wildtyp bestand und eine Termination des Wachstums im Hauptmeristem auftrat. Die Anzahl an Rosettenblättern, die nach dem Transfer für die Pflanzen in langen Photoperioden bestimmt wurde, gab dann die Anzahl der zum Zeitpunkt der Überführung tatsächlich gebildeten Blätter wieder. Nach Hempel und Feldman (1994) erfolgt nach einer induzierenden Photoperiode der Wechsel von einer vegetativen zu einer reproduktiven Entwicklungsphase.

Nach 32 Tagen Anzucht in kurzen Photoperioden konnten für den Wildtyp, sowie für die beiden Mutanten *sc122-1 sc127-1* und *sc16-1 sc122-1 sc127-1* zum Zeitpunkt des Transfers im Durchschnitt 11, nach 41 Tagen 16 und nach 47 Tagen 20 Blätter gezählt werden. Am nachfolgenden Zeitpunkt, 53 Tage, konnten für den Wildtyp 29 ($\pm 2,5$) Blätter bestimmt werden. Die Doppel- und die Tripelmutante wiesen zu diesem Zeitpunkt nur etwa 22,5 ($\pm 1,2$) Blätter auf (Abb. 3-15).

Die Gesamtzahl an Blättern war für die Doppel- und Tripelmutante nach einer Anzucht von 32 Tagen im Kurztag identisch mit der des Wildtyps (Abb. 3-15). Ein Hinweis, dass zwischen den Zeitpunkten 32 und 41 Tagen eine Veränderung im Meristem der Tripelmutante auftreten muss, konnte aus der Reduktion der Anzahl an Pflanzen, die nach 41 Tagen unter Kurztagbedingungen noch eine Hauptinfloreszenz bildeten, gezogen werden. Diese Beobachtung wurde durch die niedrige Bildungsrate an Blättern für Pflanzen der Tripelmutante bestätigt, die sich kaum von der nach 32 Tagen Anzucht unterschied (Abb. 3-15). Eine Anzucht der *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Pflanzen in kurzen Photoperioden, die eine Dauer von 32 Tagen überschritt, verringerte die Kompetenz, das Hauptmeristem zu erhalten (Abb. 3-15).

Für die *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante lag die kritische Dauer für eine nicht verhinderbare Termination zwischen den Zeitpunkten 41 und 47 Tagen Anzucht in

kurzen Photoperioden. Nach 41 Tagen unter Kurztagbedingungen bildete die Doppelmutante im Durchschnitt 25 und nach 47 Tagen im Durchschnitt 26 Rosettenblätter aus. Im Gegensatz dazu bildeten Col-0/Ws-Wt-Pflanzen nach Anzucht für 41 Tage in kurzen Photoperioden 32 und nach 47 Tagen 35 Rosettenblätter. Ein weiteres Indiz zur Identifizierung des kritischen Zeitpunkts lieferte die Anzahl gebildeter Blüten. Diese war für die Doppel- und Tripelmutante im Vergleich zum Wildtyp bereits zum Zeitpunkt von 41 Tagen deutlich niedriger.

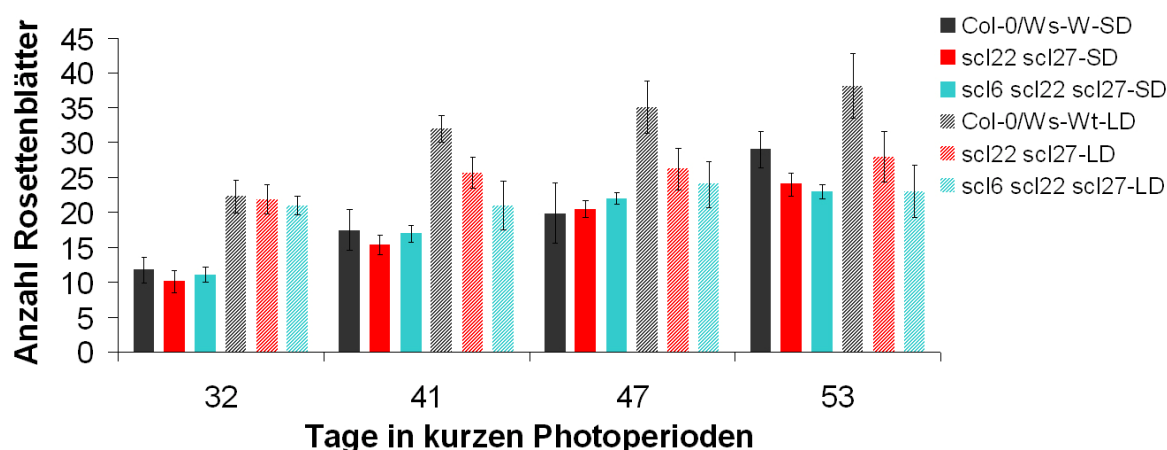


Abb. 3-15 Graphische Darstellung der Rosettenblattentwicklung in *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Das Diagramm gibt die durchschnittliche Anzahl an Rosettenblättern zum Zeitpunkt des Transfers (32, 41, 47 oder 53 Tage) vom Kurztag in den Langtag für *scl22-1 scl27-1* (*scl22 scl27-SD*), *scl6-1 scl22-1 scl27-1* (*scl6 scl22 scl27-SD*) und den Wildtyp (*Col-0/Ws-Wt-SD*) wieder. Für jedes Zeitintervall wurde zum Zeitpunkt der Blüte des *Col-0/Ws-Wt* im Langtag die Anzahl der Rosettenblätter erneut gezählt, um die absolute Anzahl an gebildeten Rosettenblättern zum Zeitpunkt des Transfers in den Langtag zu bestimmen (*scl22 scl27-LD*, *scl6 scl22 scl27-LD* und *Col-0/Ws-Wt-LD*). Für alle Zeitpunkte (32, 41, 47 und 53 Tage) wurden jeweils 7 Pflanzen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuteten darauf hin, dass der Zeitpunkt der Blühinduktion positiv auf den Erhalt des Apikalmeristems in der Doppel- und Tripelmutante wirkt.

3.5.2 Analyse der *35S::miR171 constans*-Pflanzen

Die in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Pflanzen der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante und der *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Tripelmutante ein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Blühinduktion und der Fähigkeit des Erhalts eines intakten Apikalmeristems besteht. So konnten *sc122-1 sc127-1* oder *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Pflanzen, die weniger als fünf Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden und anschließend in den Langtag überführt wurden, eine primäre Infloreszenz mit etwa 80 Blüten bilden. Wurde die Phase der Kultivierung im Kurztag allerdings verlängert, zeigten die Doppel- und Tripelmutanten den beschriebenen Terminationsphänotyp des Apikalmeristems.

Es stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Termination des Hauptmeristems durch eine verlängerte Kultivierung in kurzen Photoperioden und der Wirkung von einem der Integratoren der Blühinduktion besteht.

Der Einfluss des photoperiodischen Signalwegs wurde durch die Erzeugung einer Doppelmutante zwischen der *35S::miR171*-Linie und einer T-DNA-Insertionslinie für den *CONSTANS (CO)*-Locus untersucht. Mutationen im *CO*-Gen führen zu einer verspäteten Induktion der Blüte im Langtag (Puterill, 1995). Es wurde untersucht, ob *35S::miR171 co*-Pflanzen im Langtag einen Terminationsphänotyp zeigten, der dem Phänotyp der *35S::miR171*-Linie im Kurztag ähnelte (Kapitel 3.2.1). Der Phänotyp der *35S::miR171*-Linie ist dominant und tritt auch in heterozygoter Form in Erscheinung. In einer segregierenden F₂-Population der Kreuzung *35S::miR171 co* wurde daher eine Segregation der Phänotypen im Verhältnis von 9:3:3:1 angenommen (Tab. 3-5).

Es zeigte sich, dass *35S::mir171 co*-Pflanzen in langen Photoperioden einen Terminationsphänotyp ausbildeten, der dem in den Kapiteln 3.2.1, 3.4.5 und 3.5.1 beschriebenen ähnelte (Abb. 3-16, C-D). Die gewählten Charakteristika für eine Zuordnung zum *35S::miR171 co*-Phänotyp waren neben der Termination des Hauptmeristems die Anzahl gebildeter Blätter zum Zeitpunkt der Blühinduktion und die Anzahl angelegter Blüten bis zum Zeitpunkt der Samenreife. In Kapitel 3.5.1 wurde beschrieben, dass die Anzucht von *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Pflanzen für eine definierte Periode unter Kurztagbedingungen zur Ausprägung des Terminationsphänotyps in einer nachfolgenden Kultivierung unter Langtagbedingungen ausreichte. Es konnte beobachtet werden, dass die Termination graduelle Unterschiede aufwies. Es wurden auch solche Pflanzen detektiert, die einen primären Trieb bildeten. Dieser legte aber nur eine geringe Anzahl an Blüten an und stellte dann das Wachstum ein (Abb. 3-16, D). Diese Beobachtungen waren die Grundlage, die F₂-Pflanzen der Kreuzung

35S::mir171 x co, die einen vergleichbaren Phänotyp zeigten, ebenfalls der Gruppe der terminierten *35S::mir171 co*-Pflanzen zuzuordnen.

Die nachfolgende Analyse zeigte allerdings, dass die Phänotypen in der F2-Population nicht wie erwartet segregierten (Tab. 3-5). In einer Population von 96 F2-Pflanzen konnten statt der erwarteten 54 Pflanzen des *35S::mir171*-Verzweigungsphänotyps im Langtag lediglich 20 Pflanzen gezählt werden (Tab. 3-5 und Abb. 3-16, A). Es wurde angenommen, dass ein Wildtyp-Phänotyp in 18 der untersuchten 96 Pflanzen auftrat. Im Langtag wird der Übergang zur Blüte im Wildtyp und der *35S::mir171*-Linie normalerweise nach der Bildung von 11 bis 13 Rosettenblättern eingeleitet. Ein Kriterium, die Pflanzen dem Phänotyp des Wildtyps zuzuordnen, war daher die Anzahl angelegter Rosettenblätter zum Zeitpunkt der Blühinduktion. Die Anzahl gebildeter Rosettenblätter in Pflanzen einer F1-Generation der Kreuzung *35S::mir171 x co* betrug im Durchschnitt 17,1 Rosettenblätter. Dieses Kriterium traf in der F2-Population auf fünf Pflanzen, anstatt der erwarteten 18, zu (Tab. 3-5 und Abb. 3-16, E). Wildtypische Pflanzen, die weniger als 17 Rosettenblätter anlegten, traten in der Population nicht auf.

Anzahl analysierter F2-Pflanzen (n=96)	<i>35S::mir171</i>	Wildtyp	<i>35S::mir171 co</i>	<i>co</i>
erwartete Segregation	54	18	18	6
tatsächliche Segregation	20	5	48	23

Tab. 3-5 Segregationsanalyse der F2-Population von *35S::mir171 co*-Pflanzen. Angegeben sind die erwarteten Segregationsereignisse für eine Population von 96 individuellen Pflanzen. Sie werden der tatsächlichen Segregation gegenübergestellt.

Auch die Anzahl von Pflanzen mit einem *35S::mir171 co*-Phänotyp entsprach nicht den zu erwartenden Verhältnissen (Tab. 3-5; Abb. 3-16, C-D). Erwartet wurde, dass in der Population in 3 von 16 Fällen ein *35S::mir171 co*-Phänotyp auftreten würde. Tatsächlich wurde dieser Phänotyp aber für 48 von 96 Pflanzen beobachtet (Tab. 3-5). Im Durchschnitt wurden bei den 48 Pflanzen dieses Phänotyps 23 Rosettenblätter und 3,7 Blüten gezählt. Die Anzahl der Rosettenblätter, die bis zur Termination des Wachstums in den *35S::mir171 co*-Pflanzen gebildet wurden, entsprach den Werten, die für die *35S::mir171*, *sc122-1 sc127-1* oder *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Linien im Kurztag bestimmt wurden (Kap. 3.2.1; Kap. 3.4.5).

Die *co*-Mutation führt zu einer verspäteten Blühinduktion im Langtag. Das Kriterium, die Pflanzen einem *co*-Phänotyp zuzuordnen, war daher die Anzahl angelegter

Rosettenblätter bis zum Zeitpunkt der Blühinduktion. Die Anzahl der Pflanzen, die einen *co*-Phänotyp ausprägten, lag höher als die rechnerische Erwartung. 23 Pflanzen anstatt der erwarteten sechs Pflanzen prägten den *co*-Phänotyp aus (Tab. 3-5). Ausschlaggebend für die Einordnung der Pflanzen in diese Phänotypenklasse war ebenfalls die Anzahl gebildeter Blätter bis zur Blüte (Abb. 3-16, B). Im Durchschnitt wurden in den 23 Pflanzen 47 Rosettenblätter angelegt.

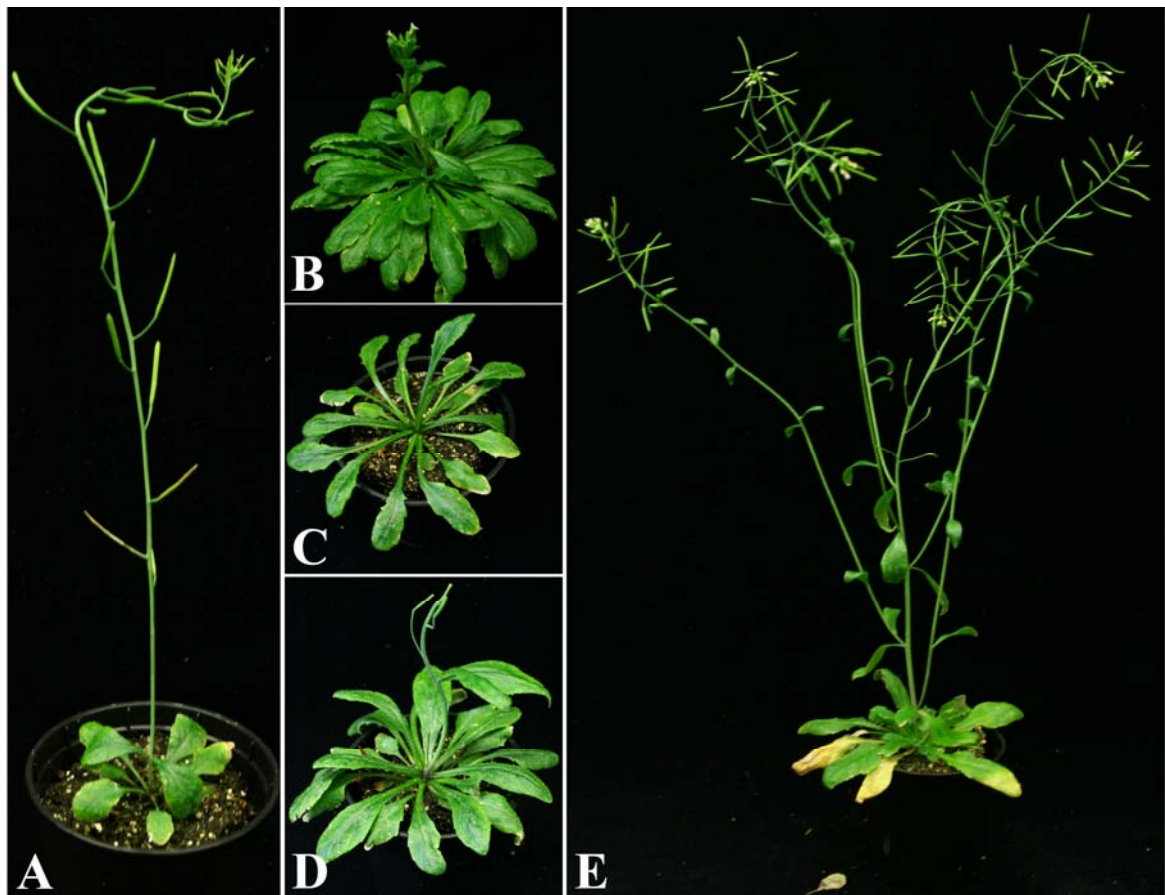


Abb. 3-16 Phänotypen einer F2-Population von *35S::miR171 co*-Pflanzen. **(A)** Der *35S::miR171*-Einzelphänotyp trat in 20 F2-Pflanzen in Erscheinung. **(B)** Den *co*-Blühzeitphänotyp im Langtag zeigten 23 Pflanzen. **(C-D)** Der Terminationsphänotyp der *35S::miR171 co*-Pflanzen kam in unterschiedlicher Stärke zur Ausprägung. In **(C)** abgebildet ist eine *35S::miR171 co*-Pflanze, die keinen primären Trieb bildete und nach etwa 20 Blättern das Wachstum einstellte. In einigen Fällen konnte jedoch beobachtet werden, dass *35S::miR171 co*-Pflanzen einen primären Trieb formten, nach der Anlage von einigen Blüten das weitere Wachstum aber einstellten **(D)**. **(E)** Nur fünf Pflanzen konnten einem Wildtyp-Phänotyp zugeordnet werden.

Das Auftreten einer Termination des Hauptmeristems von *35S::miR171*-Pflanzen in einem *co*-Hintergrund unter Langtagbedingungen wies darauf hin, dass der Zeitpunkt der Blühinduktion wesentlich zur Ausprägung der Termination des Hauptmeristems beitrug.

Die Daten zeigten außerdem, dass das *co*-Allel sich gegenüber einem Wildtyp *CO*-Allel nicht rezessiv, sondern dominant ausprägte. Eine molekulare Analyse der Population wird darüber Auskunft geben, welches Allel den *co*-Phänotyp in der Population verursachte.

3.6 Analyse der Doppelmutanten von *las-4* mit *scl6-1*, *scl22-1* oder *scl27-1*

In den nachfolgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob *LAS* und die drei *SCL* Gene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* in einer Abhängigkeit zueinander stehen. Es wurde untersucht, ob *LAS*, welches ebenfalls zur Familie der GRAS-Gene gehört, mit *SCL6*, *SCL22* oder *SCL27* gemeinsam an einem Regulationsweg wirkt. Denkbar war, dass der Funktionsverlust in einem der drei *SCL*-Gene zu einer Verstärkung des *las-4* Verzweigungsdefekts führen würde. Ein Verstärker des *las-4* Verzweigungsphänotyps, *eo15*, wurde in Kapitel 3.1 vorgestellt. Für *eo15* wurde ein im Vergleich zu *las-4* veränderter Blühzeitpunkt gefunden (Kapitel 3.1). Die mögliche Abhängigkeit der Gene voneinander wurde untersucht, indem Doppelmutanten zwischen den Einzelmutanten *scl6-1*, *scl22-1*, *scl27-1* und der *las-4*-Mutante erzeugt wurden. In segregierenden F₂-Populationen konnten jeweils für beide Mutationen homozygote Pflanzen mittels molekularer Analyse bestätigt und deren Phänotypen in einer nachfolgenden F₃-Generation im Detail beschrieben werden.

Die Ermittlung der Blühzeitpunkte für alle drei Doppelmutanten mit *las-4* sollte klären, ob *las-4* und eines der *SCL*-Gene gemeinsam auf die Blühinduktion wirken. Für diesen Parameter wurden für die Doppelmutanten keine Unterschiede zu den korrespondierenden Kontrollen gefunden (Daten nicht gezeigt).

3.6.1 Charakterisierung der *scl6-1 las-4*-Doppelmutante

Eine Doppelmutante zwischen *scl6-1* und *las-4* wurde durch Kreuzung beider Einzelmutanten zueinander erzeugt. Zur Analyse des *scl6-1 las-4*-Phänotyps wurden homozygote *scl6-1 las-4* F₃-Pflanzen parallel zu *las-4*-Einzelmutanten in kurzen und langen Photoperioden angezogen. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ergab sich, dass die *scl6-1*-Mutation weder unter Kurz- noch Langtagbedingungen einen Einfluss auf den *las-4*-Phänotyp hatte. Ein besonderes Interesse galt einer möglichen Verstärkung des *las-4*-Verzweigungsphänotyps durch das *scl6-1*-Allel während der reproduktiven Phase. Ähnlich wie für *las-4* beschrieben (Clarenz, 2004), fehlte auch in *scl6-1 las-4*-Pflanzen häufig in den ältesten Stängelblattachsen der sekundäre Trieb.

Darüber hinaus konnte keine Reduktion der reproduktiven Verzweigung beobachtet werden. Eine Untersuchung des Verzweigungsmusters der *scl6-1 las-4*-Pflanzen während der vegetativen Entwicklungsphase führte zu gleichen Ergebnissen. Das Verzweigungsmuster der Doppelmutante *scl6-1 las-4* unterschied sich nicht von dem der *las-4*-Einzelmutante.

3.6.2 Charakterisierung der *scl22-1 las-4*-Doppelmutante

Die Analyse der *scl22-1 las-4*-Doppelmutante erfolgte unter Lang- und Kurztagbedingungen. Der Habitus der *scl22-1 las-4*-Pflanzen wurde mit *las-4*-Pflanzen verglichen. Offensichtliche Abweichungen des *scl22-1 las-4*-Phänotyps vom *las-4*-Phänotyp während der vegetativen Phase wurden dabei nicht beobachtet.

Die Vergleiche der Phänotypen der *scl6-1 scl22-1*, *scl6-1 scl27-1* und *scl22-1 scl27-1*-Pflanzen (Kapitel 3.4.1, 3.4.2 und 3.4.3) führte zu der Annahme, dass die Genprodukte von *SCL22* und *SCL27* möglicherweise eine redundante Funktion bei der Anlage von Seitentrieben ausüben. Ein Funktionsverlust des *SCL22* Genprodukts in Kombination mit dem des *las-4*-Allels würde sich demnach nicht in einer Veränderung des *las-4*-Phänotyps niederschlagen. Die Analyse der *scl22-1 las-4*-Pflanzen lieferte einen weiteren Hinweis für diese Annahme. Ein Vergleich des Verzweigungsmusters während der reproduktiven Entwicklungsphase zwischen *scl22-1 las-4* und *las-4* zeigte, dass einige *scl22-1 las-4*-Pflanzen zwar den *las-4*-Verzweigungsphänotyp (Clarenz, 2004) in den ältesten Stängelblattachsen aufwiesen. Die Anlage sekundärer Triebe in den übrigen Blattachsen war in dieser Entwicklungsphase nicht betroffen.

Die makroskopische Analyse der Seitentriebeanlage innerhalb der vegetativen Entwicklungsphase zeigte, dass auch die *scl22-1 las-4*-Mutanten keine Veränderungen zum Verzweigungsmuster von *las-4*-Pflanzen aufwiesen. Das *scl22-1*-Allel führte auch in den jüngsten Rosettenblattachsen zu keiner Reduktion der Anlage von Seitentrieben.

3.6.3 Analyse der *scl27-1 las-4*-Doppelmutante

Eine Besonderheit der *scl27-1 las-4*-Doppelmutante war, dass das *scl27-1*-Allel einen *Ws* und das *las-4*-Allel einen Col-0-Hintergrund aufwies. In einer segregierenden F₂-Population der Kreuzung *scl27-1* x *las-4* konnten für beide Mutationen homozygote Pflanzen mittels molekularer Analyse bestätigt werden. Der Unterschied in der Architektur dieser Pflanzen trat in der F₂-Generation bereits deutlich in Erscheinung. So

war die Anlage sekundärer Triebe während der reproduktiven Phase stark reduziert (Abb. 3-17, A-D). Nur in den jüngsten Stängelblattachseln wurde ein Seitentrieb gebildet. Dieser Verzweigungsphänotyp der *scI27-1 las-4*-Pflanzen, der den der *las-4*-Pflanzen bereits in hohem Maße verstärkte, sollte in einer nachfolgenden F3-Generation genauer untersucht werden.



Abb. 3-17 Habitus von *scI27-1 las-4*-Doppelmutanten in kurzen Photoperioden. (A-D) Vergleich des *las-4*-Phänotyps (A) mit dem einer *scI27-1 las-4* F2-Pflanze (B-D). (C) Auch in der reproduktiven Phase war ein zum *las-4*-Phänotyp verändertes Verzweigungsmuster zu erkennen (C). (E) Der Verzweigungsdefekt der *scI27-1 las-4*-Mutante trat in einer homozygoten F3-Generation stärker in Erscheinung. Dort variierten die Phänotypen und es konnte zwischen Pflanzen, die der *scI27-1 las-4*-Pflanze der F2-Generation glichen (B, E, Mitte) und solchen, die einem *edl*-Phänotyp (Kap. 3.1) glichen (E, links, rechts) unterschieden werden.

Es zeigte sich, dass in der F3-Population die Verzweigung innerhalb der reproduktiven Phase eine deutlichere Reduktion erfuhr, als dies für die F2-Generation beobachtet werden konnte (Abb. 3-17, A, E). Die Anlage tertiärer Triebe war in der *las-4*-Einzelmutante in den ersten zwei Blättern der Seitentriebe häufig reduziert. Es zeigte sich, dass diese Reduktion durch das *scI27-1*-Allel verstärkt wurde und die meisten Blattachseln der sekundären Triebe keine lateralen Triebe anlegten.

3.7 RNA *in situ* Hybridisierungen zur Analyse der gewebespezifischen Expression von *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* im Wildtyp und von *LAS*, *STM* und *WUS* in Apices der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante und der Tripelmutante

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente zur RNA *in situ* Hybridisierung (RNA-ISH) für die Gene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* in Col-0-Wildtyp-Sprossspitzen besprochen. Zum Nachweis der Transkripte wurden Gegensinn-RNA Sonden für die oben genannten Gene verwendet, die durch den Einbau von Digoxigenin markiertem UTP anschließend durch eine Antikörperreaktion im Gewebe detektiert werden konnten. Der Nachweis erfolgte durch eine Farbreaktion, vermittelt durch eine an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase. In den RNA-ISH-Experimenten wurden je 10 Apices verwendet.

3.7.1 Analyse der gewebespezifischen Expression von *SCL27* in Wildtyp-Apices während der vegetativen und reproduktiven Phase

Der Ausfall des Genprodukts von *SCL27* hatte in der *sc127-1*-Einzelmutante vorwiegend eine Wirkung auf die Seitentriebbildung in der vegetativen Entwicklungsphase. Die Analyse der Doppelmutante *sc122-1 sc127-1* zeigte, dass das Protein *SCL27* auch eine Funktion in der Anlage von sekundären Trieben innerhalb der reproduktiven Phase hat (Kap.3.4.3). Die Analyse der Expression von *SCL27* wurde daher für beide Entwicklungsphasen in Sprossspitzen, in denen die Anlage von Seitentrieben erfolgt, durchgeführt.

Die Expression des *SCL27*-Gens wurde in vegetativen und reproduktiven Apices von Pflanzen, die entweder für 28 Tage im Kurztag wuchsen oder nachfolgend für 7 lange Photoperioden induziert wurden, in Längs- und Querschnitten untersucht. *SCL27*-Transkripte konnten im Apikalmeristem, im Leitbündel des Sprosses und in jungen Blättern nachgewiesen werden.

In Längsschnitten von vegetativen und reproduktiven Apices fand sich eine Transkriptakkumulation der *SCL27*-Transkripte im Apikalmeristem (Abb. 3-18, A, Pfeilspitzen, C, D, Pfeil). Im vegetativen Meristem erstreckte sich die Expressionsdomäne von *SCL27* vertikal von Zellen der L2-Schicht bis zu Zellen des Rippenmeristems (Abb. 3-18, A, Pfeil). Die Expressionsstärke von *SCL27* in der L1- und L2-Schicht schien für den Bereich der zentralen Zone schwächer zu sein, als für die L1- und L2-Schicht der peripheren Zone. Die laterale Expressionsdomäne schloss die Zellen der peripheren Zone und der Transitionszone mit ein (Abb. 3-18, A). In Längsschnitten von 7 Tagen in

langen Photoperioden induzierten Col-0-Sprossspitzen konnten *SCL27*-Transkripte im Infloreszenzmeristem detektiert werden (Abb. 3-18, C-D). Die Expressionsstärke war auch hier nicht gleichmäßig im gesamten Meristem verteilt. Die stärkste Expression wurde in der peripheren Zone gefunden, aus deren Zellen die Primordien gebildet werden. Die vertikale Expressionsdomäne von *SCL27* umfasste alle drei Schichten der peripheren Zone. Die Expression von *SCL27* in der zentralen Zone, zu der die Stammzellzone und das „organising center“ gerechnet werden, war im Vergleich zur Expression in der peripheren Zone schwächer. *SCL27*-Transkription wurde auch in Blütenprimordien und im Blütenmeristem detektiert (Abb. 3-18, C-D, J, Pfeilspitzen).

RNA-ISH-Experimente in Querschnitten vegetativer und reproduktiver Apices dienten neben der Untersuchung der *SCL27*-Transkription in Blättern auch der Analyse der *SCL27*-Transkriptansammlung in Achseln der Primordien (Abb. 3-18, F-H). Für *LAS*, *RAX1* und *RAX3*, die die Anlage von Meristemen positiv regulieren, wurde eine achselspezifische Expression beschrieben (Greb, 2003; Müller, 2005). *SCL27*-Transkripte wurden in den untersuchten Querschnitten nicht im adaxialen Bereich der Blattprimordien detektiert. In Längsschnitten von Apices konnten *SCL27*-Transkripte in Lateralmeristemen unterschiedlicher Entwicklungsstadien innerhalb der reproduktiven Phase nachgewiesen werden (Abb. 3-18; E). Nach Long und Barton (2000) kann die Entwicklung der Lateralmeristeme zu Seitentrieben in vier Entwicklungsschritte unterteilt werden. In Abbildung 3-18, E sind die Entwicklungsstufen 3 (Pfeil) und 4 (Pfeilspitze) zu erkennen. Diese Stadien sind durch eine deutliche Aufwölbung der meristematischen Zellen (3) und die Anlage von Blattprimordien (4) gekennzeichnet (Long und Barton, 2000).

In Längsschnitten vegetativer Apices konzentrierte sich die Akkumulation der *SCL27*-Transkripte in jüngeren Blättern auf die zentral gelegenen Bereiche des Blattes, zu denen auch das vaskuläre System gehört (Abb. 3-18, A, Pfeilspitze). Die Analyse der gewebespezifischen Expression im Querschnitt führte zu einem genaueren Bild der *SCL27*-Transkription im Blatt. Deutlich zu erkennen war die Expression im medianen Bereich jüngerer Blätter. Dabei war die Expression in jüngeren Blättern nicht auf die Leitbündel des vaskulären Systems beschränkt, sondern zeigte im Gegensatz zu dem vaskulär exprimierten Gen *REV* und dem frühen Marker des vaskulären Systems, *ATHB8*, eine breitere Expressionsdomäne, die sich erst in älteren Blättern im Wesentlichen auf den Bereich der Leitbündel des Blattes fokussierte (Abb. 3-18, H-I; Greb, 2003; Dengler 2006). Die *SCL27*-Expression im medianen Bereich der Blätter und um den Zentralzylinder im Haupttrieb konnte durch RNA-ISH in Querschnitten von reproduktiven Sprossspitzen näher untersucht werden (Abb. 3-18, J-L). So zeigte sich, dass sich die in jungen Blättern anfangs ausgedehnte Expressionsdomäne von *SCL27* in

älteren Blättern auf einen zentralen Bereich beschränkte. Ein Unterschied zu den Expressionsdomänen der vaskulär exprimierten Gene *REV* und *ATHB8* war hier allerdings, dass die Expression von *SCL27* nicht nur auf die Leitbündel beschränkt war, sondern entlang der gesamten medianen Blattachse zu finden war (Abb. 3-18, H und K, Pfeilspitzen).

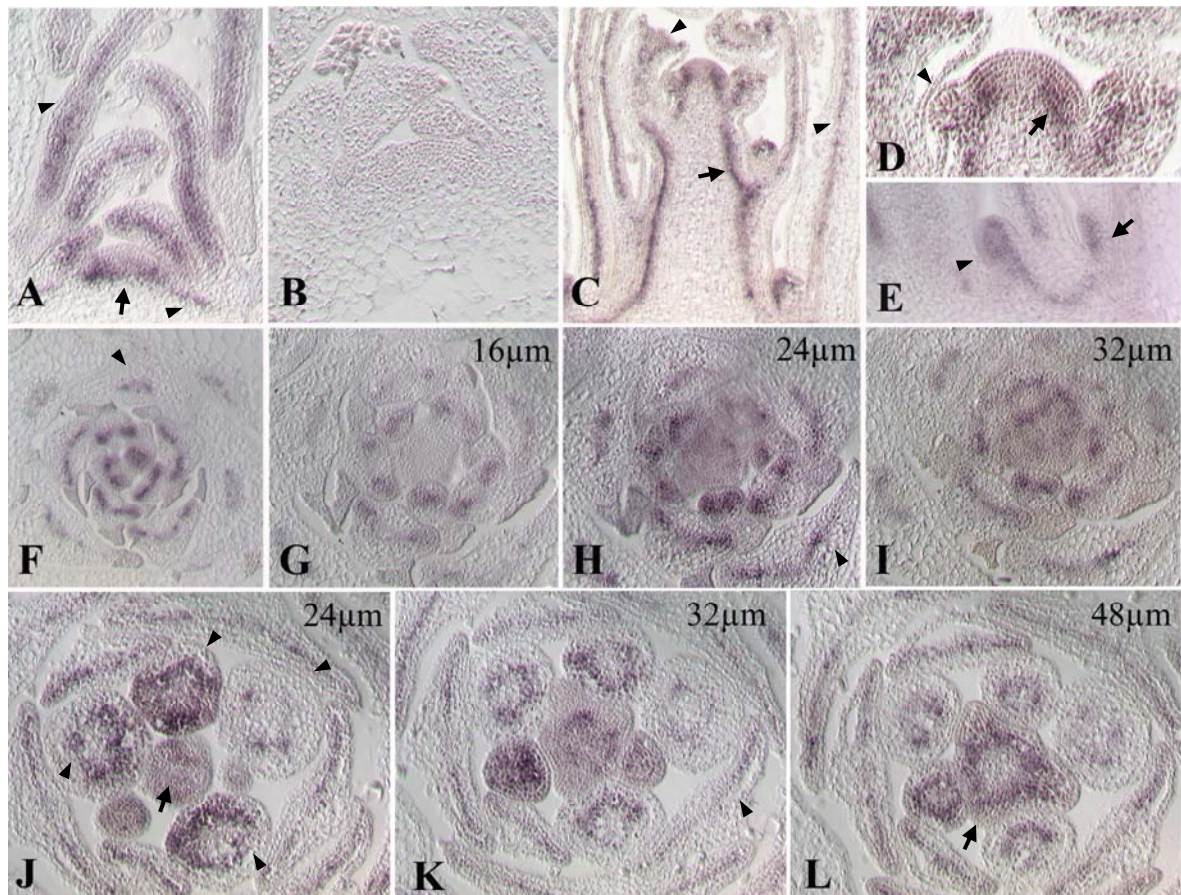


Abb. 3-18 Analyse der Transkription von *SCL27* in Col-0-Wildtyppflanzen. (A) Längsschnitt durch ein 28 Tage altes vegetatives Meristem, hybridisiert mit einer Gegensinn-Sonde zur *SCL27* mRNA. (B) Sinn-Kontrolle von *SCL27*. (C, D) Nachweis des *SCL27*-Transkripts in einem reproduktiven Meristem, das nach 28 Tagen Kurztag mit 7 langen Photoperioden induziert wurde. (E) *SCL27*-Transkripte fanden sich in Lateralmeristemen von verschiedenen Entwicklungsstadien. (F-L) Sukzessive Querschnitte durch ein vegetatives Meristem (F-I) (28 Tage Kurztag) und ein reproduktives Meristem (J-L) (28 Tage Kurztag plus 7 lange Photoperioden). Eine Abschätzung der Entfernung von der Spitze des Meristems bis zur Mitte der Schnitte ist in der oberen rechten Ecke der Abbildungen (G-L) angegeben.

Der Schnitt durch den Apex in Abb. 3-18, J war auf dem Niveau des Infloreszenzmeristems und traf die Blütenmeristeme auf unterschiedlicher Höhe, so dass, je nach Schnittebene, die Meristeme oder die Leitbündel durch die *SCL27*-Gegensinn-Sonde markiert wurden. Die tieferen Schnittebenen im reproduktiven Apex

zeigten deutlich eine ringförmige Expression von *SCL27* im Haupttrieb (Abb. 3-18, L, Pfeil). Diese ringförmige Expression entsprach den Grenzen des Zentralzylinders (Carlsbecker und Helariutta, 2006).

In Längsschnitten der vegetativen und reproduktiven Apices konnten *SCL27*-Transkripte mit dem Bereich der Leitbündel assoziiert werden (Abb. 3-18, A, Pfeilspitze, C, Pfeil). Die Expression von *SCL27* in oder flankierend zum vaskulären System erstreckte sich über die gesamte Länge des Haupttriebs. (Abb. 3-18, C, Pfeil). Ob *SCL27* direkt im vaskulären System exprimiert ist, wird in weiteren Studien untersucht. Ebenso bleibt zu klären, in welchen Zelltypen der Leitbündel *SCL27*-Genaktivität vorkommt.

3.7.2 Untersuchung der Transkriptakkumulation von *SCL22* in Wildtyp-Apices

Auch die Analyse der Expressionsdomäne von *SCL22* erfolgte in vegetativen und reproduktiven Sprossspitzen des Col-0-Wildtyps. Es zeigte sich, dass *SCL22* ein ähnliches Expressionsmuster wie *SCL27* aufwies. Allerdings war die Expressionsstärke von *SCL22* in allen untersuchten Apices im Vergleich zu *SCL27* schwächer. Diese Überschneidung war ein weiterer Hinweis auf mögliche redundante Funktionen der beiden Proteine. *SCL22* wurde in vegetativen Apices ebenfalls im Meristem detektiert (Abb. 3-19, A). Die Expression konnte allen Zellschichten des Apikalmeristems zugeordnet werden. Eine Expression von *SCL22* in der L1- und L2-Schicht der zentralen Zone war nachzuweisen (Abb. 3-19, A, Pfeil). Ferner konnte eine *SCL22*-Transkriptansammlung in der medianen Achse der Blätter und den Leitbündeln des Sprosses beschrieben werden (Abb. 3-19, A, Pfeilspitzen).

In Längsschnitten von reproduktiven Apices konnten *SCL22*-Transkripte ebenfalls im Infloreszenzmeristem und entlang der vaskulären Leitbahnen im Spross und in den Blättern gefunden werden (Abb. 3-19, C-D). Ähnlich wie für die Expression von *SCL27* im Infloreszenzmeristem (Kap. 3.7.1), konnte für *SCL22* die höchste Signalintensität in Zellen der peripheren Zone beobachtet werden (Abb. 3-19, D, Pfeil).

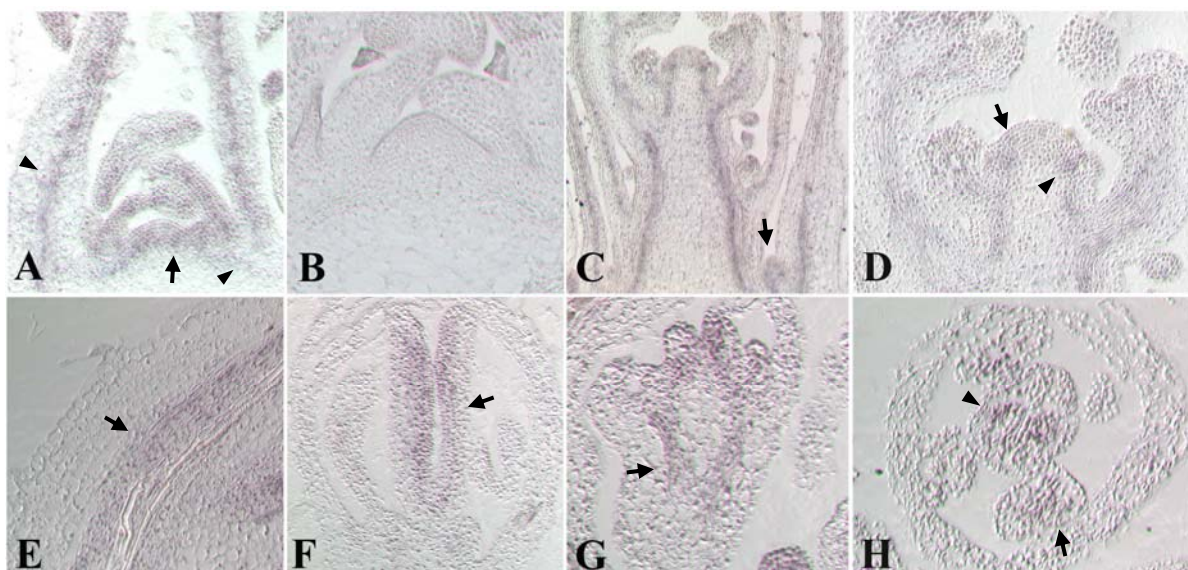


Abb. 3-19 Transkriptakkumulation von *SCL22* in vegetativen und reproduktiven Col-0-Apices. **(A)** Expression von *SCL22* im vegetativen Apex (28 Tage Kurztag). **(B)** Sinn-Kontrolle von *SCL22*. **(C, D)** *SCL22*-Transkriptionsdomäne in einem reproduktiven Apex, der nach 28 Tagen Kurztag 7 Tage in langen Photoperioden induziert wurde. **(E)** Expression von *SCL22* im Stängelblatt entlang der Leitbündelbahnen. **(F)** Expression von *SCL22* im adaxialen Bereich der Karpelle. **(G)** *SCL22*-Transkripte konnten in vaskulären Strängen sich entwickelnder Blüten und in den Karpellen detektiert werden. **(H)** Der Querschnitt durch eine Blüte zeigte die Expression von *SCL22* in Karpellen und Stamen.

Eine Expression von *SCL22* in Blütenprimordien und in Blütenmeristemen wurde ebenfalls detektiert (Abb. 3-19, D, Pfeil). Die Untersuchung der Expression von *SCL22* in Blüten zeigte, dass *SCL22*-Transkripte in den Karpellen (Abb. 3-19, F-H) und dort spezifisch an der adaxialen Seite nachgewiesen werden konnten (Abb. 3-19, F, Pfeil). In Querschnitten durch Blüten zeigten sich neben der Expression in den Karpellen (Abb. 3-19, H, Pfeilspitze) außerdem *SCL22*-Transkripte in Stamen (Abb. 3-19, H, Pfeil). In der Nahaufnahme der Expressionsdomäne von *SCL22* in einem Blatt konnte eine Überschneidung mit der Expression des *REV*-Gens beobachtet werden (Abb. 3-19, E; Greb, 2003). Diese die Leitbündel flankierende Expression wurde auch in sich entwickelnden Blüten detektiert (Abb. 3-19, G, Pfeil). Die Untersuchung der *SCL22*-Expressionsdomäne in reproduktiven Apices zeigte, dass eine zu *SCL27* vergleichbare Lateralmeristem-spezifische Expression von *SCL22* vorlag (Abb. 3-19, C, Pfeil).

Die Analysen der Transkriptakkumulation für *SCL22* und *SCL27* zeigten eine Überschneidung beider Expressionsdomänen. Das ähnliche Expressionsmuster war ein weiterer Hinweis auf eine funktionelle Redundanz der Proteine *SCL22* und *SCL27*. Um auszuschließen, dass Kreuzhybridisierungen stattgefunden hatten und die *SCL22*- und *SCL27*-Gegensinn-Sonden auch mit Transkripten des jeweils anderen Gens

hybridisierten, wurde ein weiteres RNA-ISH-Experiment durchgeführt. In dieser Analyse wurden *SCL22* und *SCL27* Gegensinn-Sonden verwendet, die, im Vergleich zu den in Kapitel 3.7.1 und 3.7.2 verwendeten Sonden, um ca. 300 bp verkürzt waren. Ein Vergleich der gewählten Sequenzbereiche für die *SCL22*- und *SCL27*-Gegensinn-Sonden zeigte, dass eine Sequenzübereinstimmung zwischen beiden Sequenzen sehr gering war. Eine Kreuzhybridisierung konnte somit ausgeschlossen werden. Mit diesen Sonden durchgeführte RNA-ISH-Analysen zeigten das gleiche Expressionsmuster für die Gene *SCL22* und *SCL27*, wie die vorangegangenen RNA-ISH-Experimente.

3.7.3 Analyse der gewebespezifischen *SCL6*-Expression in Wildtyp-Sprossspitzen

RNA-ISH-Experimente wurden auch mit einer Gegensinn-Sonde für das Gen *SCL6* durchgeführt. Von allen *HAM*-ähnlichen Genen aus *A. thaliana* zeigt *SCL6* die größte Sequenzhomologie zu *HAM* aus Petunie (Kap. 3.2). Es wurde deshalb untersucht, ob eine zu *HAM* ähnliche Expression von *SCL6* gefunden werden konnte (Stuurman *et al.*, 2002). Für die Analyse des *SCL6*-Transkriptionsmusters wurden Sonden verschiedener Länge verwendet (Kap. 2.1).

Der Nachweis der Transkriptakkumulation wurde in Längs- und Querschnitten vegetativer und reproduktiver Sprossspitzen durchgeführt (Abb. 3-20, A-F). Die Expressionsstärke war in allen untersuchten Präparaten gering. Für *SCL6* konnte eine Expression im vegetativen Meristem und dort im axilären Bereich junger Primordien festgestellt werden (Abb. 3-20, A, Pfeil). Ein Querschnitt durch ein vegetatives Meristem zeigte eine Expression von *SCL6* in Achseln der Rosettenblätter. Diese Expressionsdomäne erstreckte sich allerdings nicht über den gesamten adaxialen Bereich des Primordiums, sondern schien dort im Zentrum der Achsel fokussiert zu sein (Abb. 3-20, D, Pfeilspitzen). Die achselspezifische Expression von *SCL6* konnte auch in Achseln älterer Blätter entlang des reproduktiven Sprosses detektiert werden (Abb. 3-20, C, Pfeilspitze; E, Pfeil). Im Infloreszenzmeristem fand eine Transkriptakkumulation ausschließlich in der peripheren Zone statt (Abb. 3-20, B, Pfeilspitze).

SCL6-Transkripte wurden auch in Blütenprimordien detektiert (Abb. 3-20, C, Pfeil). Im Blütenmeristem wurde *SCL6* in den Achseln der Primordien von Sepalen transkribiert (Abb. 3-20, B und F, Pfeil). Ein Querschnitt durch eine Blüte zeigte, dass *SCL6*-Transkripte, wie auch die Transkripte von *SCL22* und *SCL27*, in den Karpellen detektiert werden konnten (Abb. 3-20, G).

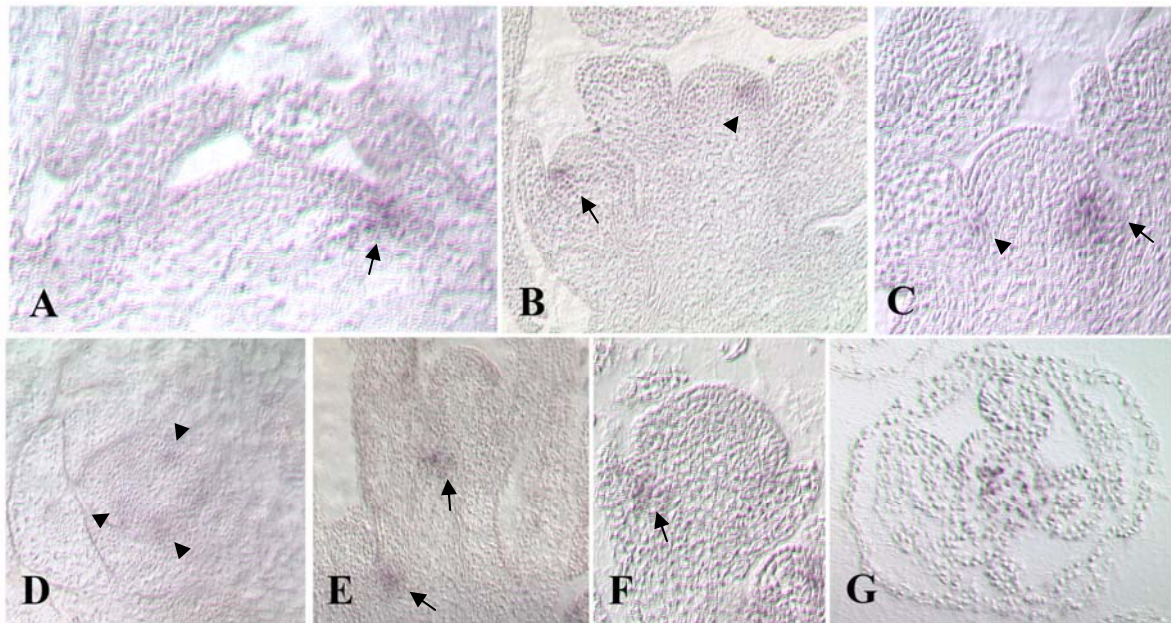


Abb. 3-20 Analyse der Akkumulation von *SCL6*-Transkripten in vegetativen und reproduktiven Sprossspitzen. Für die Analyse des *SCL6*-Transkriptionsmusters wurden Sonden verschiedener Länge verwendet. In diesen RNA-ISH-Experimenten wurde eine Sonde verwendet, die die Basen 16 - 293 der kodierenden Sequenz von *SCL6* umfasste. **(A)** Expression von *SCL6* in einem vegetativen Apex (28 Tage Kurztag). In **(B)** abgebildet ist ein Längsschnitt eines reproduktiven Apices, in dem die Expressionsdomäne von *SCL6* im Meristem und den Achseln der Sepalen erkennbar ist. **(C)** Infloreszenzmeristem, in dem die Blütenprimordiumspezifische Expression von *SCL6* deutlich zu erkennen ist. **(D)** Querschnitt durch ein vegetatives Meristem. Eine schwache Expression von *SCL6* war als kreisförmige Domäne im Zentrum der Primordiumachsel zu erkennen. **(E)** *SCL6*-Transkripte wurden entlang des Sprosses in Stängelblattachseln detektiert. **(F-G)** *SCL6* war im Blütenmeristem in den Achseln der Sepalen **(F)** und in Blüten in den Karpellen **(G)** exprimiert.

3.7.4 Expressionsstudien für *STM* und *LAS* in Apices von *sc122-1 sc127-1* und *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Pflanzen

Um die Funktion der *SCL*-Gene bei der Regulierung der Lateralmeristembildung mit dem bereits beschriebenen Meristemidentitätsgen *STM* (Long und Barton, 2000) und dem Lateralmeristemmarker *LAS* (Greb, 2003) in eine funktionale Beziehung setzen zu können, wurden weitere RNA-ISH-Experimente durchgeführt. Es wurde untersucht, ob eine Veränderung der Expression dieser Gene in den Achseln der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante oder der Tripelmutante vorliegt. Ein vergleichbares Experiment wurde für die Verzweigungsmutante *las-4* durchgeführt (Greb, 2003). In *las-4* Mutanten wird die Bildung von Seitentrieben in der vegetativen Phase unterdrückt. Mittels RNA-ISH, in dem eine Gegensinn-Sonde für *STM* verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass die *STM*-Expression in den Achseln von *las-4* nicht erhalten bleibt (Greb, 2003). *STM* ist im Wildtyp vom Primordium P0 bis zum P21 exprimiert. Ab P16 erfährt die *STM*-

Expressionsdomäne eine Fokussierung auf das Zentrum in der Blattachsel (Greb, 2003).

Die Untersuchung des Verzweigungsmusters in der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante und der Tripelmutante zeigte, dass nur in 14 Prozent der Achseln der Doppelmutante ein Seitentrieb, ein Blatt oder ein Meristemdom ermittelt wurde. Alle übrigen Achseln waren leer und zeigten keine Strukturen mehr, von denen auf das Vorhandensein eines Meristems geschlossen werden konnte. In der Tripelmutante trat dieser Verzweigungsphänotyp verstärkt auf. Nur in durchschnittlich 2 Prozent der untersuchten Achseln wurde ein Meristemdom erfasst (Kap. 3.4.4 und 3.4.5).

Eine Analyse des *STM*-Expressionsmusters wurde auch durchgeführt, um Ursachen für den beschriebenen Terminationsphänotyp der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante und der Tripelmutante in kurzen Photoperioden zu finden (Kapitel 3.8.1). Es sollte geklärt werden, ob eine Veränderung in der *STM*-Expression bereits in jungen Apices feststellbar war. Aus diesem Grund wurden für erste RNA-ISH-Experimente 21 Tage junge vegetative Sprossspitzen der Doppelmutante *sc122-1 sc127-1* verwendet. Zunächst wurde die Expression von *STM* in Längsschnitten der Doppelmutante parallel zu Längsschnitten von Col-0-Sprossspitzen untersucht. Es zeigte sich, dass das Expressionsmuster von *STM* im Meristem der Doppelmutante im Vergleich zum Col-0-Wildtyp unverändert war (Abb. 3-21, A-B).

Die Längsschnitte durch die Sprossspitzen der *sc122-1 sc127-1*-Pflanzen erlaubten ebenfalls eine Untersuchung der Struktur des Meristems. Möglicherweise war eine Ursache für die Termination des Apikalmeristems in der Doppel- und Tripelmutante unter Kurztagbedingungen auch in einer Veränderung der Morphologie des Meristems begründet. Im Vergleich zu vegetativen Wildtyp-Meristemen wurde tatsächlich eine Veränderung im Meristem der *sc122-1 sc127-1*-Pflanzen beobachtet. Der Wildtyp ist gekennzeichnet durch ein etwa sechs Zellschichten umfassendes Meristem (Abb. 3-21, A, C und I). Interessanterweise besaß die Doppelmutante im Gegensatz zum Wildtyp ein Meristem, das aus mehr als sechs Schichten bestand (Abb. 3-21, A-D; I-J). Im Durchschnitt lagen in einem 21 Tage alten, vegetativen *sc122-1 sc127-1* oder *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Meristem 10 Zellschichten vor (Abb. 3-21, B, D und J). Zur Veranschaulichung der Organisation der *sc122-1 sc127-1* und der *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Meristeme wurden in Längsschnitten die Zellen mittels Toluidin-Blau angefärbt (Abb. 3-24, I-J). Exemplarisch wird hier die Untersuchung in *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Apices vorgestellt. Im Vergleich zu einem parallel behandelten Längsschnitt von Col-0/Ws-Wt-Apices war deutlich die höhere Anzahl an Zellschichten mit kleinen isodiametrischen Zellen im *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Meristem zu erkennen (Abb. 3-21, I-J).

Die *STM* RNA-ISH-Analysen ließen außerdem erkennen, dass sich die Expressionsdomäne von *STM* über die gesamten 10 Zellschichten erstreckt. Neben der Zellmorphologie war dies ein weiterer Hinweis darauf, dass die zusätzlichen Zellschichten einen meristematischen Charakter aufwiesen.

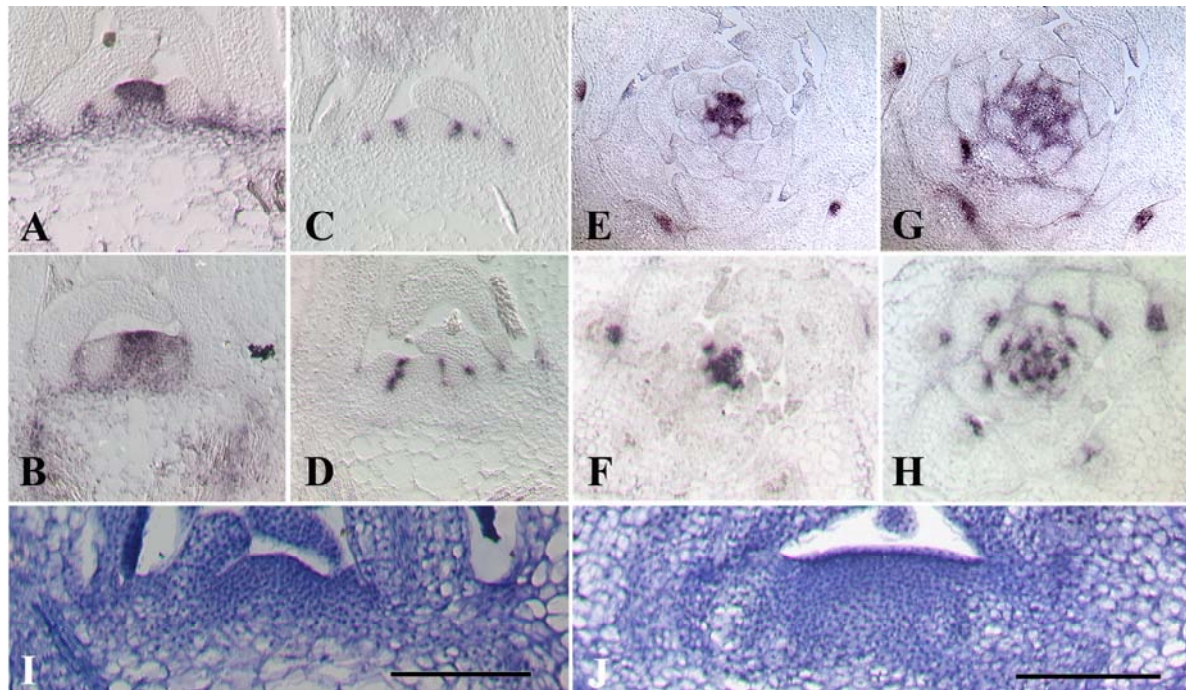


Abb. 3-21 Analyse der *STM* und *LAS*-Transkriptakkumulation in vegetativen *sc122-1 sc127-1*-Sprossspitzen und Strukturanalyse des *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Meristems. (A-B) Vergleich der Transkriptakkumulation von *STM* in 21 Tage alten vegetativen Col-0-Wt (A) und *sc122-1 sc127-1*-Sprossspitzen (B) im Längsschnitt. (C-D) Expressionsmuster von *LAS* in vegetativen (21 Tage alten) Col-0-Wt-Apices (C) im Vergleich zu vegetativen (21 Tage alten) *sc122-1 sc127-1*-Sprossspitzen (D). (E-H) Querschnitt eines Col-0-Wt-Meristems (E, G) und eines *sc122-1 sc127-1*-Meristems (F, H). Die Gewebe in E-H wurden mit einer *STM* Gegensinn-Sonde hybridisiert. (I-J) Toluidin-Blau gefärbte Längsschnitte eines vegetativen (21 Tage alten) Col-0/Ws-Wt-Apex (I) und eines vegetativen (21 Tage alten) *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Apex (J). Maßstab in I und J: 100 µm. Zum Vergleich wurden die Bilder der RNA-ISH mit *STM* in Col-0-Wt-Apices (E, G) mit freundlicher Genehmigung den Arbeiten von Greb (2003) entnommen.

Die Untersuchung des in Achselmeristemen spezifisch exprimierten Gens *LAS* in vegetativen *sc122-1 sc127-1*-Sprossspitzen führte zu vergleichbaren Beobachtungen. Die Expressionsdomäne von *LAS* in Apices der Doppelmutante war im Vergleich zum *LAS*-Expressionsmuster in Col-0-Apices nicht verändert (Abb. 3-21; C-D). Anhand der *LAS*-Expression in *sc122-1 sc127-1*-Pflanzen war die Vielschichtigkeit der Meristeme besonders deutlich erkennbar, da die Expressionsdomäne nicht auf die üblichen sechs Zellschichten beschränkt war (Greb, 2003), sondern sich über etwa 9-10 Schichten erstreckte (Abb. 3-21; C-D).

Die Analyse der *STM*-Expression in den Achseln von *scl22-1 scl27-1* oder *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen wurde im Rahmen dieser Arbeit für beide Mutanten durchgeführt. Die achselspezifische Expression von *STM* wurde anhand von Querschnitten vegetativer Col-0 und *scl22-1 scl27-1*-Apices untersucht. Anders als für die *las-4*-Mutante beschrieben (Greb, 2003) und entgegen den Erwartungen war *STM*-Expression in allen Achseln der *scl22-1 scl27-1*-Pflanzen detektierbar. Eine Fokussierung der *STM*-Expression in den Achseln älterer Primordien konnte ebenfalls beobachtet werden. In der Tripelmutante wurde ein identisches Expressionsmuster gefunden.

3.8 Untersuchungen zu Veränderungen im Apikalmeristem von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen bei Kultivierung in kurzen Photoperioden

3.8.1 Analyse der Morphologie von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristemen

Die Veränderungen des Meristems in *scl22-1 scl27-1* und in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen (Kapitel 3.8) waren Anlass zu einer detaillierteren Untersuchung der Meristeme. Für die *ham*-Mutante wurde eine Differenzierung der Zellen des Apikalmeristems beschrieben (Stuurman *et al.*, 2002). In der Analyse der Meristeme von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen wurde untersucht, ob diese Differenzierung auch in *A. thaliana* zu beobachten war.

Die Untersuchungen zur Ausprägung des Terminationsphänotyps der Tripelmutante nach unterschiedlich langer Anzucht im Kurztag zeigten, dass eine Veränderung des Meristems, die möglicherweise eine Ursache für die Termination des Apikalmeristems in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen war, bereits nach 35 Tagen Kultivierung in kurzen Photoperioden auftrat (Kap. 3.8). Darüber hinaus zeigte sich, dass schon in 21 Tage alten Meristemen der Tripelmutante Änderungen in der Morphologie festgestellt werden konnten (Kap. 3.8). Dieser Zeitpunkt wurde in die nachfolgende Analyse mit einbezogen. Es wurden Sprossspitzen von *scl6-1 scl22-1 scl27-1* und Col-0/Ws-Wt-Pflanzen nach 21, 28, 35, 42 oder 49 Tagen Anzucht in kurzen Photoperioden geerntet, fixiert und in Paraplast eingebettet (Kap. 2.2.12.3). Für jeden Zeitpunkt wurden Längsschnitte für die Tripelmutante und den Wildtyp angefertigt. Die Behandlung der Gewebe mit Toluidin-Blau führte zur Anfärbung der Zellkerne und des Zytoplasmas. Dadurch konnte eindeutig zwischen kleinen zytoplasmatischen und großen, vornehmlich vakuolisierten Zellen, unterschieden werden.

Bereits in 21 Tage alten *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen konnten im Vergleich zum Col-0/Ws-Wt mehr als sechs Schichten kleiner Zellen im Meristem detektiert werden (Abb. 3-22, A-D). Im Durchschnitt wurden vier zusätzliche Zellschichten im Meristem der Tripelmutante erfasst. Eine weitere Besonderheit fiel bei der Betrachtung des Bereichs unterhalb des Meristems auf. Diese Zellen sind in der Regel bereits ausdifferenziert und Bestandteil des Sprosses. Für den Wildtyp konnte in diesem Bereich eine klare Organisation der Zellen beobachtet werden (Abb. 3-22; B, Pfeil). In der Tripelmutante schien dieser Bereich unorganisierter zu sein. Den sich an die Grenze des Meristems anschließenden ausdifferenzierten Zellen folgte eine Schicht kleinerer Zellen (Abb. 3-22, D, Pfeil).

Bei Analysen von Meristemen älterer Sprossspitzen konnte eine weitere Zunahme der Anzahl von Zellschichten in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristemen beobachtet werden (Abb. 3-22, G-H). Im Durchschnitt wurden in 28 Tage alten Meristemen etwa 12 Schichten statt der sechs im Col-0/Ws-Wt gezählt (Abb. 3-22, F). Auch der Bereich des Sprosses war in den *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Apices (Abb. 3-22, G) im Vergleich zum Wildtyp verändert (Abb. 3-22, E). Der Anteil vakuolisierter Zellen schien geringer zu sein und insgesamt lag eine kompaktere Struktur vor.

In 35 Tage alten *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Apices (Abb. 3-22, L) war die Anzahl der Zellschichten um etwa 8 im Vergleich zum Col-0/Ws-Wt (Abb. 3-22, J) erhöht. Im Durchschnitt lagen etwa 14 Schichten in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristemen vor. Es fiel auf, dass auch in 35 Tage alten Sprossspitzen im Gegensatz zum Wildtyp (Abb. 3-22, J) eine klare Abgrenzung zu Zellen des Sprosses unterhalb des Meristems fehlte (Abb. 3-22, L, Pfeil). Besonders deutlich war in diesen Apices auch die zunehmende Reduktion vakuolisierter Zellen des Sprossgewebes zu erkennen (Abb. 3-22, K).

Als weitere auffällige morphologische Abweichung des *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristems fiel die veränderte Form auf. Vegetative Wildtyp-Meristeme von *A. thaliana* weisen einen domförmigen Bau auf und sind in der Regel durch eine deutlich erkennbare Meristemspitze gekennzeichnet (Abb. 3-22, J, Pfeil; Long und Barton, 2000). Im Gegensatz dazu erschien das Meristem der Tripelmutante flacher. Diese Veränderungen traten bereits in Meristemen der Pflanzen auf, die zu den Zeitpunkten 21 oder 28 Tage untersucht wurden (Abb. 3-22, D, H).

Die Untersuchung der Meristeme von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen, die für 42 Tage in kurzen Photoperioden wuchsen, zeigte, dass die Anzahl der Zellschichten in diesen Meristemen noch weiter erhöht war (Abb. 3-22, P). Im Durchschnitt konnten 18 Schichten in den *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristemen erfasst werden. Dies waren etwa

12 Schichten mehr, als sie im parallel kultivierten Wildtyp vorgefunden wurden (Abb. 3-22, N).

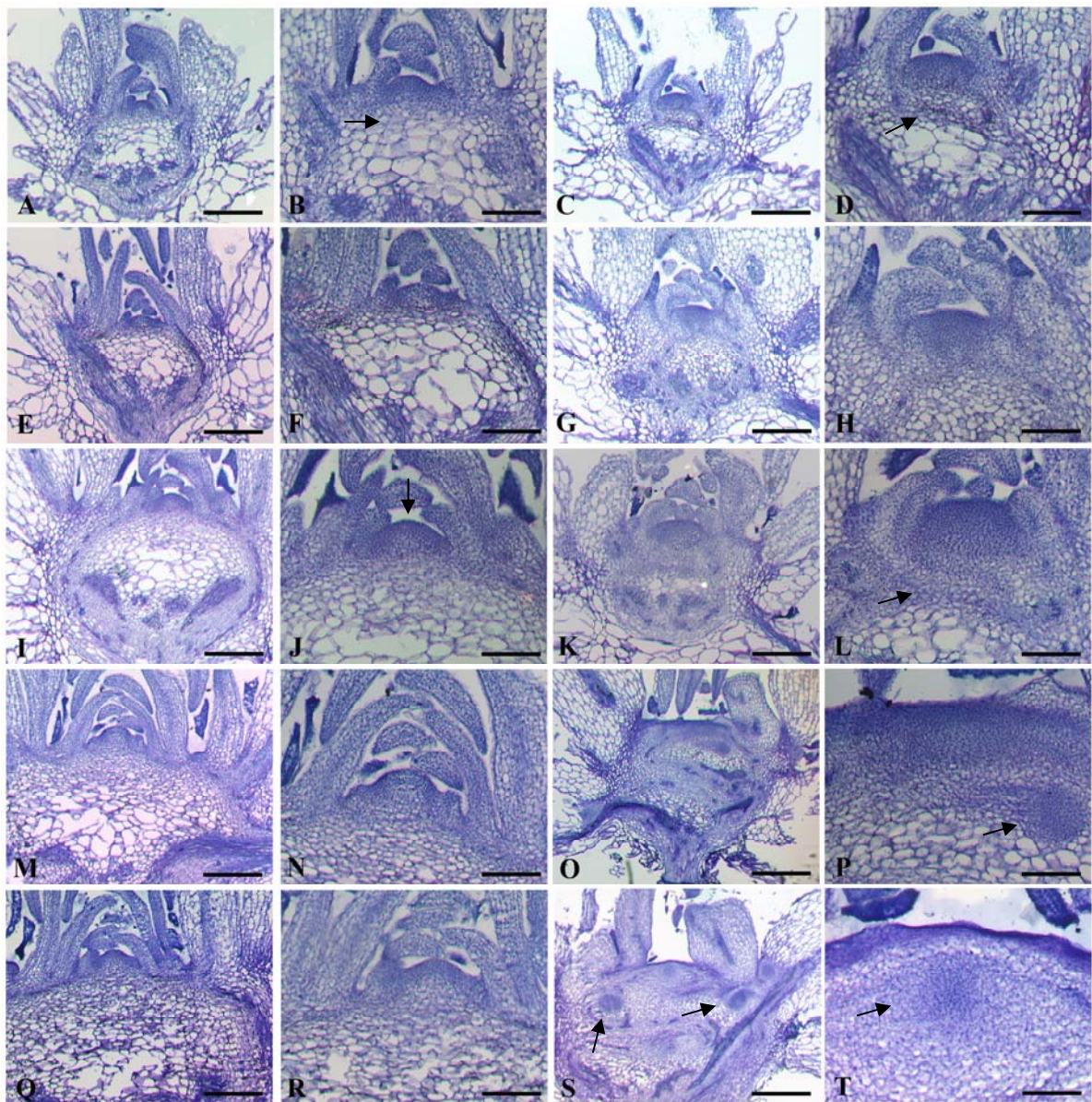


Abb. 3-22 Meristemorganisation von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Apices im Vergleich zum Col-0/Ws-Wt. Abgebildet sind Längsschnitte vegetativer Sprossspitzen von Col-0/Ws-Wt-Pflanzen (**A-B, E-F, I-J, M-N, und Q-R**) im Vergleich zu Apices von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen (**C-D, G-H, K-L, O-P und S-T**). Die Morphologie des Meristems und des Sprossgewebes wurde zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die Struktur der Zellen wurde durch Toluidin-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Die Abbildungen in (**A-D**) zeigen den Zeitpunkt nach 21 Tagen, (**E-H**) nach 28 Tagen, (**I-L**) nach 35 Tagen, (**M-P**) nach 42 Tagen und (**Q-T**) den Zeitpunkt nach 49 Tagen Kultivierung in kurzen Photoperioden. Maßstab in A, C, E, G, I, K, M, Q: 200 µm; in B, D, F, H, J, L, N, P, R, T: 100 µm und in O und S: 500 µm.

Ein weiterer Unterschied zwischen den *scl6-1 scl22-1 scl27-1* und den Col-0/Ws-Wt-Meristemen bestand in der lateralen Ausdehnung. Die apikale Region von *A. thaliana*

Wildtyp-Meristemen wies üblicherweise einen Durchmesser von etwa 100 µm auf (Abb. 3-22, B, F, J, N, R). In der Tripelmutante nahm bei längerer Anzucht in kurzen Photoperioden auch dieser Durchmesser zu. Der Durchmesser für die Meristeme von 21 und 28 Tage alten *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Sprossspitzen betrug noch etwa 100 µm (Abb. 3-22, D und H). Für 35 Tage alte Meristeme konnte bereits eine Zunahme auf etwa 150 µm festgestellt werden (Abb. 3-22, L) und nach 42 Tagen betrug dieser etwa 250 µm (Abb. 3-22, P).

Besonders deutlich war in den Präparaten der 42 Tage alten Meristeme außerdem die veränderte Organisation des Sprossgewebes zu erkennen (Abb. 3-22, O). Neben Bereichen, die große, vakuolisierte Zellen enthielten, traten auch Zentren auf, die durch kleine Zellen charakterisiert waren. Ein solches Zentrum kleiner Zellen ist in Abbildung 3-22 (P) direkt unterhalb des Apikalmeristems zu sehen (Pfeil). Entsprechende Veränderungen waren im Apex des Wildtyps nicht zu erkennen (Abb. 3-22, M).

In 49 Tage alten *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Sprossspitzen konnte bei einigen Präparaten eine weitere Veränderung im Meristem ermittelt werden. So trat eine kreisförmige Fokussierung von kleinen Zellen im Meristem auf (Abb. 3-22, S; T, Pfeil). Der Durchmesser der apikalen Region betrug etwa 300 µm (Abb. 3-22, S).

Das klassische Tunica-Corpus-Konzept konnte für die *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristeme anhand dieser histologischen Analyse nicht bestätigt werden. Eine antikline Zellteilung in der L1- und L2-Schicht war nicht deutlich zu erkennen und Zellen der L1- oder L2-Schicht schienen nicht von denen des Corpus abgegrenzt zu sein.

Ein wesentlicher Unterschied zu den Daten von Stuurman *et al.* (2002) war durch die Präsenz kleiner Zellen im apikalen Bereich von Meristemen der Tripelmutante gegeben. Das Meristem der terminierten *ham*-Mutante zeichnete sich durch ausdifferenzierte Zellen aus.

Eine Ansammlung der oben genannten kleinen Zellen konnte im gesamten Sprossgewebe der 49 Tage alten *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen beobachtet werden (Abb. 3-22, S). Dabei waren diese über den Spross verteilt. Sie traten unmittelbar unter dem Apikalmeristem, in der Mitte des Sprosses oder seitlich, nahe den Ansatzpunkten der Rosettenblätter, auf (Abb. 3-22, S, Pfeile). Aufgrund der Analogie dieser Zellen zu denen des Meristems wurde angenommen, dass sie einen meristematischen Charakter besitzen und ektopische Meristeme im Spross darstellen (siehe Kap. 3.8.3. für weiterführende Untersuchungen). Ein Vergleich der Spross-

organisation der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen mit der des Wildtyps zeigte, dass die Zentren kleiner Zellen im Wildtyp nicht auftraten (Abb. 3-22, Q).

3.8.2 Untersuchungen zur Dynamik der ektopischen Meristeme im Spross von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen

Die Eigenschaften der putativen Meristeme im Spross der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen wurden anhand der in Kapitel 3.8.1 beschriebenen Toluidin-Blau gefärbten Längsschnitte näher untersucht. Exemplarisch ist in Abb. 3-23 der Apex einer *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanze abgebildet, die für 49 Tage in kurzen Photoperioden angezogen wurde. Da nur die Entwicklung der Meristemzentren im Spross beobachtet werden sollte, war die mediane Schnittebene nicht auf der Höhe des Meristems gewählt. Der Abstand zwischen den dargestellten Schnitten betrug 16 µm.

Es zeigte sich, dass die Zentren kleiner Zellen im Sprossgewebe in unterschiedlichen Formen und Ausdehnungen vorlagen (Abb. 3-23, A-D). Zu beobachten war, dass die kreisförmige Anhäufung kleiner Zellen im unteren Teil des Sprosses mehr als 96 µm tief und 250 µm breit war (Abb. 3-23, A-D, A, Pfeil). Für das Zentrum im mittleren Teil des Apex (Abb. 3-23, A, Pfeilspitze) fiel auf, dass aus diesem scheinbar ein weiteres entstand. Die Entwicklung dieses zweiten Zentrums wurde in den nächsten Schnitten verfolgt.

In Abbildung 3-23, B ist das zweite Zentrum als kreisrunde Struktur unterhalb des oberen zu erkennen (Pfeil). Die darauffolgenden Schnitte zeigen eine weitere Reduktion im Radius des oberen Zentrums (Abb. 3-23, C, Pfeilspitze) und eine Größenzunahme des sich direkt darunter entwickelnden Meristems (Abb. 3-23, C-D Pfeil). Die Beobachtungen wurden in einer schematischen Zeichnung zum deutlicheren Verständnis zusammengestellt (Abb. 3-23, E). Da anhand der Längsschnitte in Abbildung 3-23 (A-D) nicht direkt die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass die beiden übereinander liegenden Zentren miteinander verbunden waren oder sich das untere aus dem oberen entwickelt hatte, wurden die beiden Zentren als unabhängige Einheiten betrachtet.

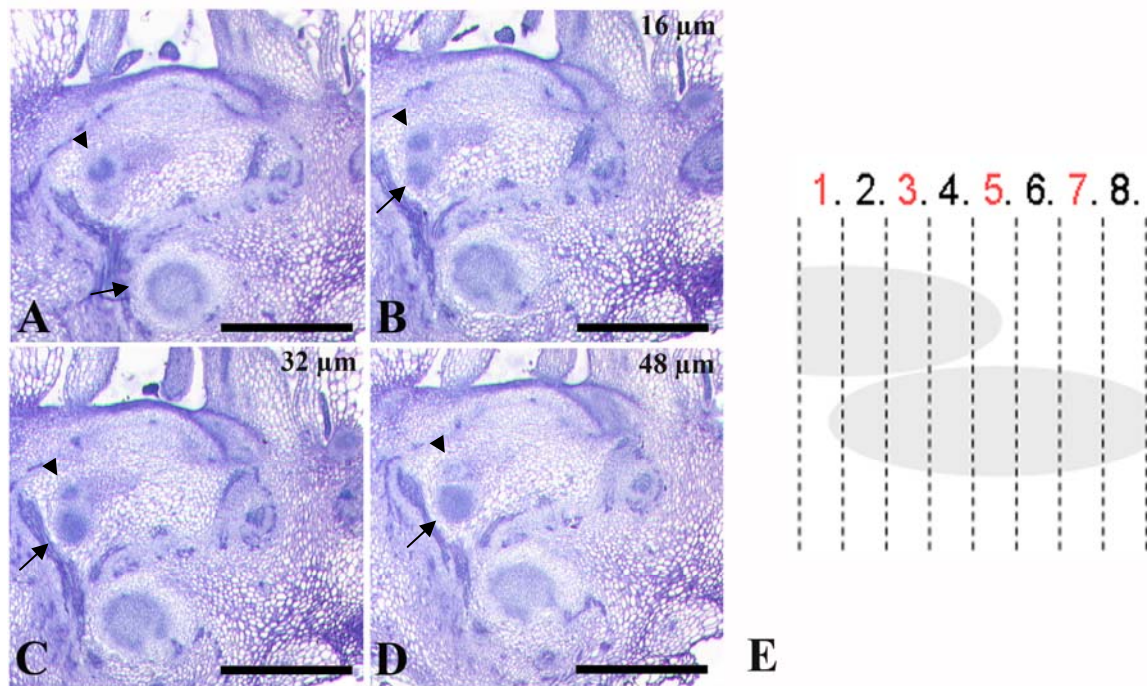


Abb. 3-23 Detailanalyse eines *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristems nach Kultivierung der Pflanzen für 49 Tage in kurzen Photoperioden. (A-D) Längsschnitte durch eine Sprossspitze der Tripelmutante. Die *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanze wurde zuvor für 49 Tage in kurzen Photoperioden angezogen. Das Gewebe wurde nach Anfertigung der Schnitte mittels Toluidin-Blau gefärbt. In **(A)** ist die erste Schnittebene durch den Apex abgebildet. **(B)** repräsentiert die dritte (16 μm), **(C)** die fünfte (32 μm) und **(D)** die siebte Schnittebene (48 μm). **(E)** Die Zeichnung spiegelt die Schnittebenen durch das in **(A-D)** dargestellte Meristem in einer Seitenansicht wider. Die Zahlen oberhalb der schematischen Zeichnung **(E)** geben die 1. bis 8. Schnittebene an. Dabei repräsentieren die rot markierten Zahlen die Schnitte, die in **(A-D)** gezeigt werden (3: 16 μm; 5: 32 μm; 7: 48 μm). Die ellipsenartigen Formen stellen die zwei oberen der in **(A-D)** gezeigten Zentren kleiner Zellen in einer seitlichen Ansicht dar. Die Ausdehnung der Zentren wurde anhand der Längsschnitte in **(A-D)** abgeleitet. (A: Die Pfeilspitze markiert das obere Zentrum im mittleren Bereich des Sprosses und der Pfeil das im Text beschriebene Zentrum im unteren Teil des Sprosses. (B-D) Die Pfeilspitze markiert das obere Zentrum im mittleren Bereich des Sprosses und der Pfeil das direkt darunter gelegene Zentrum; Maßstab: 500 μm).

3.8.3 Studien zur Expression von *STM* und *WUS* in vegetativen Sprossspitzen der Tripelmutante

Die Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchungen an vegetativen Sprossspitzen von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen, die für unterschiedliche Zeitintervalle in kurzen Photoperioden angezogen wurden, zeigten, dass neben den Veränderungen im Hauptmeristem auch das Sprossgewebe einer Modifizierung unterlag (Kap. 3.8.1).

3.8.3.1 Analyse der gewebespezifischen *STM*-Expression in vegetativen Meristemen der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Die Analyse der *STM*-Expression in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Apices wurde an Pflanzen durchgeführt, die parallel zu Col-0/Ws-Wt-Pflanzen für unterschiedlich lange Perioden im Kurztag, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, angezogen wurden. Die Daten der RNA-ISH-Analyse in Apices von Pflanzen, die 21 Tage in kurzen Photoperioden wuchsen, werden hier nicht vorgestellt, da im Vergleich zu 28 Tage alten Apices kein Unterschied im Expressionsmuster von *STM* gefunden wurde.

In den Studien zur *STM*-Expression in Apices der Tripelmutante konnten die in Kapitel 3.7.4 und 3.8.1 beobachteten Veränderungen der Meristemstruktur bestätigt werden. Bereits 28 Tage alte, vegetative *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Sprossspitzen waren durch ein abgeflachtes Meristem charakterisiert (Abb. 3-24, A-B). Dieser Phänotyp trat auch in älteren Meristemen der Tripelmutanten auf (Abb. 3-24, D-E, G-H, J-K). Die Untersuchung zur Expression von *STM* zeigte, dass das Expressionsmuster in den Meristemen der Tripelmutante im Vergleich zum Col-0/Ws-Wt unverändert schien. Allerdings konnten Abweichungen der Expressionsdomäne beobachtet werden. Eine Besonderheit der Transkriptionsdomäne von *STM* in jungen Apices der Tripelmutante wurde bereits in Kapitel 3.7.4 besprochen. Die Aktivität des *STM*-Gens war auch in Pflanzen der Tripelmutante auf die zusätzlichen Zellschichten des Meristems ausgedehnt. Die *STM*-Expressionsdomäne erschien deshalb größer (Abb. 3-24, A-B; D-E, G-H, J-K) als beim Wildtyp. Die Analyse der Expression von *STM* in Col-0/Ws-Wt-Apices zeigte, dass diese auf die sechs Zellschichten des Meristems beschränkt war. Darüber hinaus wurden keine zusätzlichen Zellschichten erkannt (Abb. 3-24, C, F, I, L).

STM markiert im Apex die Zellen, die einen meristematischen Charakter aufweisen. Obwohl Zellen des PO im Meristem morphologisch noch nicht von meristematischen Zellen unterschieden werden können, sind diese doch durch fehlende *STM*-Expression im entstehenden Blattprimordium markiert (Byrne *et al.*, 2000; Abb. 3-24, C, I, L). Deutlich erkennbar war in den Meristemen der Tripelmutante die Abgrenzung der *STM*-Expression von solchen Bereichen, aus denen sich Blattprimordien bilden (Abb. 3-24, A-B; D-E, G-H). In Apices 49 Tage alter *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen bildete sich statt dessen eine kreisförmige Expressionsdomäne von *STM*, die der in Kapitel 3.8.1 beschriebenen kreisförmigen Anordnung kleiner Zellen im Apikalmeristem ähnelte (Abb. 3-24, J-K).

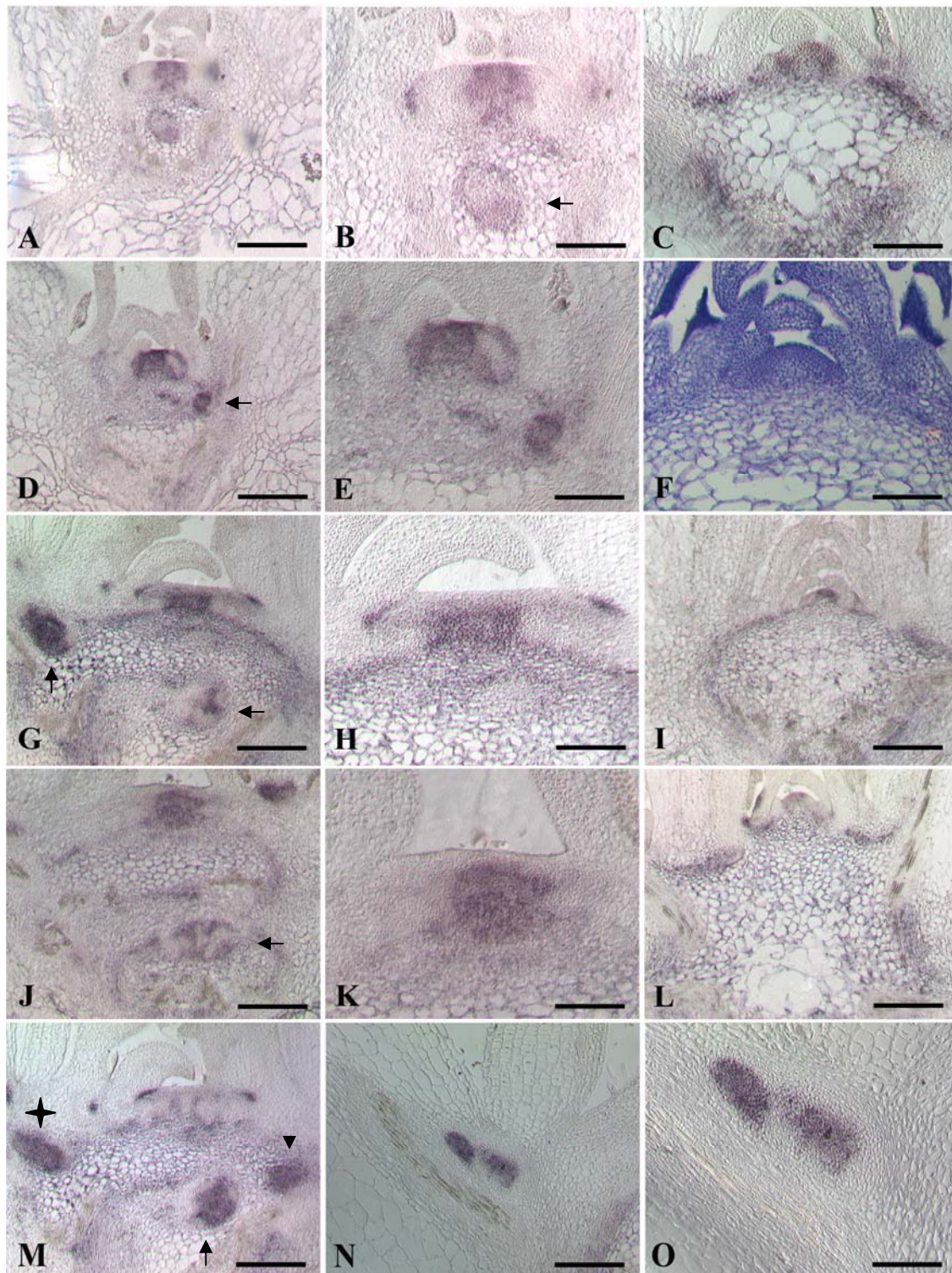


Abb. 3-24 Analyse der *STM*-Expression in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Apices zu verschiedenen Entwicklungsstadien. (A-B, D-E, G-H, J-K und M-O) geben das *STM*-Expressionsmuster in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen wieder. Die Expressionsdomäne von *STM* im Wildtyp ist in (C, I und L) gezeigt. (F) Toluidin-Blau-Färbung eines 35 Tage alten Col-0/Ws-Wt-Apex. Die Pflanzen in (A-C, D-F, G-I, M-O und J-L) wurden unter Kurztagbedingungen für 28 (A-C), 35 (D-F), 42 (G-I; M-O) bzw. 49 (J-L) Tage kultiviert. Der Maßstab in A, C, D, F, G, I, J, L, M, N beträgt 200 μm und in B, E, H, K, O 100 μm .

Die in Kapitel 3.8.1 beschriebene laterale Ausdehnung des Meristems der Tripelmutante hatte einen direkten Effekt auf die Expressionsdomäne von *STM*. So erfuhr diese ebenfalls eine Erweiterung. Für die Col-0/Ws-Wt-Apices wurde eine seitliche Ausdehnung der *STM*-Expressionsdomäne von etwa 62 µm ermittelt (Abb. 3-24, C, I, L). Die *STM*-Domäne in 28 Tage alten Apices von *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Pflanzen wies einen Durchmesser von etwa 100 µm auf. Mit zunehmendem Alter der in kurzen Photoperioden kultivierten *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Mutanten, nahm die Ausdehnung der *STM*-Expressionsdomäne zu. Der Durchmesser vergrößerte sich auf etwa 113 µm (35 Tage), 125 µm (42 Tage) und 137 µm (49 Tage).

In Kapitel 3.5.1 wurde als Zeitpunkt der Termination eine mehr als 4 Wochen andauernde Anzucht in kurzen Photoperioden ermittelt. Nach 35 Tagen traten unbekannte Veränderungen auf, so dass der Terminationsphänotyp von *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Pflanzen nicht mehr verhindert werden konnte. Um die Ergebnisse von Stuurman *et al.* (2002) zur *STM*-Expression mit der *STM*-Transkriptansammlung in terminierten *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Pflanzen zu vergleichen, wurde in diesem Experiment besonders die Expression von *STM* in 42 und 49 Tage alten Sprossspitzen untersucht. (Abb. 3-24, G-H; J-K). Eine Verminderung der *STM*-Expression, wie sie von Stuurman *et al.* (2002) für terminierte *ham*-Meristeme beschrieben wurde, konnte in Apices der Tripelmutante nicht festgestellt werden.

In Kapitel 3.8.1 wurden neue Zentren kleiner Zellen im Sprossgewebe von Pflanzen der *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Tripelmutante beschrieben. Die Analyse des *STM*-Expressions-musters in vegetativen Apices der Tripelmutante sollte auch klären, ob diese Zentren einen meristematischen Charakter aufweisen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind ebenfalls in Abbildung 3-24 dargestellt. In 28 Tage alten *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Sprossspitzen war unterhalb des Meristems eine kreisförmige Struktur zu erkennen, die deutlich durch die *STM*-Gegensinn-Sonde markiert werden konnte (Abb. 3-24, B, Pfeil). Der Durchmesser dieses Zentrums betrug etwa 75 µm.

RNA-ISH-Analysen an älteren Sprossspitzen (35, 42 und 49 Tage) zeigten auch für die Zentren kleiner Zellen im Sprossgewebe eine meristematische Identität (Abb. 3-24, D, G, J, M, Pfeil). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese Zentren als ektopische Meristeme des Sprosses bezeichnet. Die ektopischen Meristeme traten in unterschiedlicher Anzahl auf. Für die Pflanzen in Abbildung 3-24 (A und D) wurde jeweils ein ektopisches Meristem unterhalb des Apikalmeristems erfasst. Ein Vergleich der RNA-ISH-Daten in (G) und (M) der Abbildung 3-24 zeigte allerdings, dass die Anzahl der ektopischen Meristeme je nach Schnittebene variierte. In (G) ist die *STM*-Expression im Apikalmeristem deutlich zu erkennen. Gleichzeitig wurden ektopische

Meristeme im unteren und im seitlichen Teil des Sprosses durch die *STM*-Sonde markiert (Abb. 3-24, G, Pfeil). In (M) ist ein Präparat derselben Sprossspitze, die auch in (G) dargestellt ist, abgebildet. Die Schnittebene war hier nicht auf dem Niveau des Apikalmeristems gewählt, sondern lag etwa 20 µm davon entfernt. In dieser Ebene wurden im Spross drei ektopische Meristeme mittels *STM*-Sonden markiert. Neben dem in (G) beschriebenen Zentrum im unteren Teil des Sprosses war ein weiteres Meristem zu erkennen (Abb. 3-24, M, Pfeilspitze).

Das ektopische Meristem im oberen, seitlichen Bereich des Sprosses schien nicht unmittelbar vom Gewebe des Sprosses, welches sich durch große, vakuolisierte Zellen auszeichnet, umgeben zu sein (Abb. 3-24, M, Stern). Dieses ektopische Meristem war möglicherweise nicht im Sprossgewebe gebildet worden, sondern direkt einer Blattachsel zugehörig. Eine Abweichung von einem üblichen Lateralmeristem war allerdings deutlich durch die Ausdehnung der *STM*-Expressionsdomäne gegeben. Diese Annahme könnte auch für die Entstehung des Meristems, welches seitlich im unteren Bereich des Sprosses lag, zutreffen (Abb. 3-24, M, Pfeilspitze).

Die gefundenen *STM*-Expressionsmuster in (N) und (O) der Abbildung 3-24 markieren zwei Meristemzentren der Achsel. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in der histologischen Analyse der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Sprossspitzen in Kapitel 3.8.2 beschrieben.

3.8.3.2 Untersuchung der *WUS*-Expressionsdomäne in vegetativen Meristemen der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Expressionsanalysen des *A. thaliana* *WUS*-Orthologs *TERMINATOR* (*TER*) in terminierten *ham*-Apices von Petunie zeigten, dass die *TER*-Expressionsdomäne nach Einstellen des Wachstums im *ham*-Meristem nicht erhalten blieb. Der Verlust der *TER*-Expression trat in *ham*-Apices etwa zwei Wochen nach Ende des Wachstums ein (Stuurman *et al.*, 2002).

Im folgenden Experiment sollte die Expression des *WUS*-Gens in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Apices mit den für die *ham*-Mutante beschriebenen Daten verglichen werden. Besonders wichtig war, dass ein vergleichbarer Zeitpunkt der Termination für die Meristeme der Tripelmutante gefunden wurde. In Kapitel 3.5.1 wurde beschrieben, dass *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen, die länger als 35 Tage im Kurztag kultiviert und anschließend in lange Photoperioden überführt wurden, eine Termination des Wachstums aufwiesen. Besonders deutlich war diese Termination nach 42 oder 49

Tagen Anzucht unter Kurztagbedingungen. Diese Ergebnisse waren der Grund, Pflanzen bis zu 49 Tage im Kurztag zu kultivieren und dann die *WUS*-Expression zu untersuchen, da zum Zeitpunkt 49 Tage die Termination der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristeme bereits seit etwa zwei Wochen eingetreten war. Um die Veränderungen der *WUS*-Expression an Zeitpunkten zu untersuchen, die vor und nach der Termination des Meristems lagen, wurden *scl6-1 scl22-1 scl27-1* und Wildtyp-Pflanzen in der gleichen Art angezogen, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben.

WUS hat im Meristem die Funktion, durch den Erhalt der Stammzellpopulation eine unbegrenzte Aktivität des Meristems zu gewährleisten (Laux *et al.*, 1996). Die Expression von *WUS* im Wildtyp-Meristem ist in einigen Zellen der L3-Schicht der zentralen Zone zu finden. Die laterale Ausdehnung der *WUS*-Expression im Wildtyp-Meristem beschränkt sich dabei auf 3 bis 4 Zellen. (Abb. 3-25; A und E). Die Expressionsdomäne von *WUS* wird als „organising center“ (OC) bezeichnet (Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Morphologie der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristeme in Kapitel 3.8.1 und 3.8.2 zeigten, dass in der Tripelmutante die Anzahl an Zellschichten im Meristem bei Anzucht unter Kurztagbedingungen zunahm. Ein besonderes Interesse galt daher der Frage, ob die Expressionsdomäne von *WUS* im Meristem verändert war. Gleichzeitig sollte die funktionelle Aufteilung des terminierten *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Meristems charakterisiert werden.

Zum Vergleich der *WUS*-Expression in Meristemen von Wildtyp und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen wurden Daten der *WUS*-Expression in Wildtyp-Apices zum Zeitpunkt 21 (A) und 42 (E) Tage Anzucht in kurzen Photoperioden dargestellt (Abb. 3-25, A und E). Für 21 und 28 Tage alte Sprossspitzen der Tripelmutante wurde die *WUS*-Transkriptionsdomäne ab der 7. bzw. 8. Zellschicht detektiert. Es war besonders auffallend, dass die Morphologie der sich an die Domäne anschließenden Zellen nicht der des Wildtyp-Meristems entsprach (Abb. 3-25, B-D und F-G). Im Wildtyp folgen der *WUS*-Expressionsdomäne größere Zellen, die dem Rippenmeristem zugerechnet werden (Abb. 3-25, A, Pfeil und E). Der Bereich unterhalb der *WUS*-Domäne in der Tripelmutante war im Gegensatz dazu durch kleinere Zellen markiert (Abb. 3-27; B, Pfeil, C-D und F-G).

In Kapitel 3.8.1 und 3.8.2 wurde gezeigt, dass die Zunahme der Zellschichten im Meristem von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen mit der Länge der Anzucht in kurzen Photoperioden korrelierte. Es galt daher, mögliche Änderungen der *WUS*-Expressionsdomäne im Verlauf der Entwicklung der Tripelmutante im Kurztag für die fünf ver-

schiedenen Zeitpunkte, 21, 28, 35, 42 und 49 Tage, zu verfolgen. Feststellbar war, dass die Zunahme der Zellschichten im Meristem eine Verschiebung der *WUS*-Expressionsdomäne zur Folge hatte. So konnte das *WUS*-Transkript in 21 und 28 Tage alten Meristemen ab der 7. bzw. 8. Zellschicht nachgewiesen werden (Abb. 3-25, B-C). Für Meristeme 35 und 42 Tage alter Sprossspitzen wurde die Expression erstmals in der 9. bis 10. bzw. 10. bis 11. Schicht ermittelt (Abb. 3-25, D, F). In Meristemen, die für 49 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, konnten *WUS*-Transkripte etwa ab der 13. Zellschicht nachgewiesen werden.

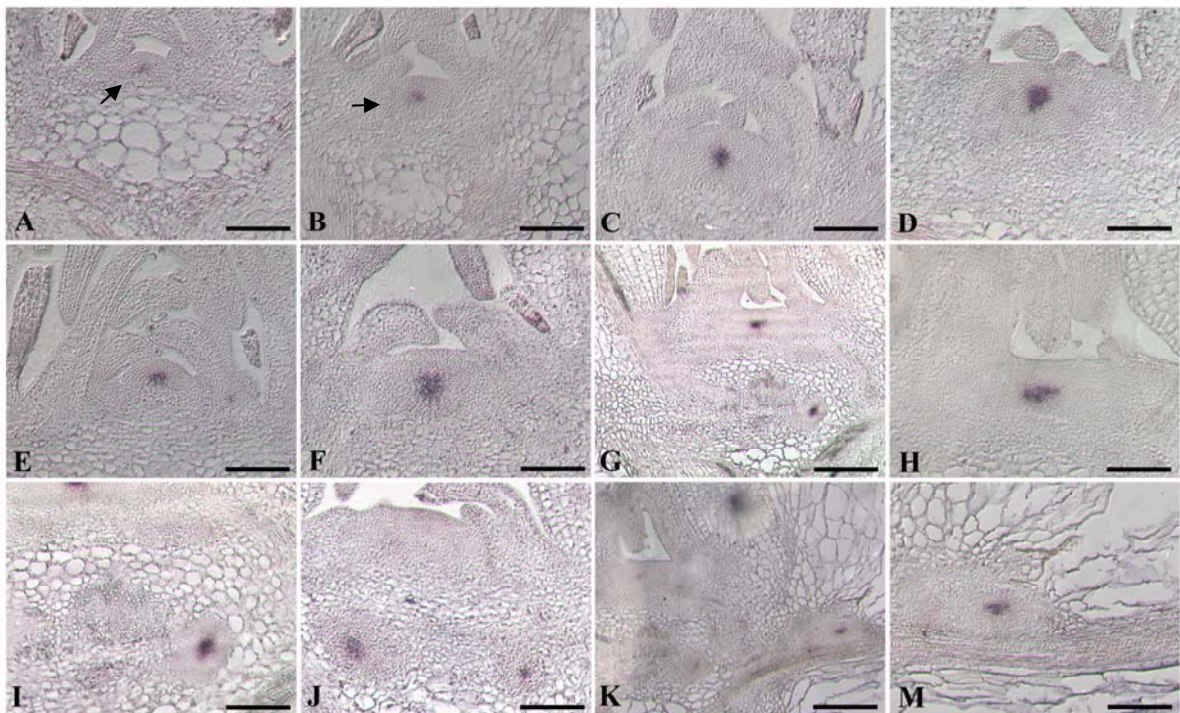


Abb. 3-25 Untersuchung der *WUS*-Transkriptionsdomäne in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen zu verschiedenen Entwicklungsphasen. (A) und (E) zeigen jeweils die Domänen der *WUS*-Transkription in Col-0/Ws-Wt-Meristemen nach 21 Tagen (A) und 42 Tagen (E) Anzucht in kurzen Photoperioden. Die Abbildungen in (B-D) und (F-M) zeigen das *WUS*-Expressionsmuster in Apices der Tripelmutante zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. (B-D) repräsentieren die Zeitpunkte 21 (B), 28 (C) und 35 (D) Tage Wachstum unter Kurztagbedingungen. (F-G) repräsentieren die *WUS*-Expressionsdomäne in 42 (F) und 49 (G) Tage alten Apices der Tripelmutante. (H-I) zeigen Nahaufnahmen der *WUS*-Expressionsdomänen im Meristem (H) und im ektopischen Meristem (I) des Apex. In (J) sind zwei ektopische Meristeme durch die *WUS*-Expression gekennzeichnet. Das Sprossgewebe entstammte einer Tripelmutante, die für 28 Tage in kurzen Photoperioden angezogen wurde. (K-M) Zu erkennen ist die *WUS*-Expression im Lateralmeristem der in (G) abgebildeten *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanze. (Maßstab: A-F, H-J, L und M: 100 µm; G und K: 200 µm).

Im Gegensatz zu den Daten der *ham*-Mutante trat in den terminierten Meristemen der Tripelmutante keine Verminderung der *WUS*-Expression auf. Als Maßstab galt die Expression von *WUS* in Meristemen von Pflanzen, die für 49 Tage in kurzen Photoperioden angezogen wurden. Einzig die Verschiebung der *WUS*-Domäne in tiefere Zellschichten des Meristems konnte als Veränderung des Expressionsmusters in der Tripelmutante beobachtet werden.

Eine weitere interessante Fragestellung bezog sich auf eine mögliche Expression von *WUS* in den ektopischen Meristemen (Kapitel 3.8.1, 3.8.2). Es stellte sich heraus, dass mittels der *WUS*-Sonde ein Signal in den Sprosszentren von 28 und 49 Tage alten Meristemen der Tripelmutante detektiert werden konnte (Abb. 3-25, G und I-J). Die Abbildung in (G) verdeutlicht, dass dieses ektopische Meristem im Gewebe des Sprosses vorgefunden wurde, da eine Schnittebene durch das Meristem gewählt wurde. Eine Nahaufnahme der *WUS*-Expressionsdomäne im Spross zeigte, dass *WUS* im Zentrum des ektopischen Meristems exprimiert wurde und von kleineren Zellen umgeben war (Abb. 3-25, I). Die *WUS*-Expression in den ektopischen Meristemen konnte auch in 28 Tage alten Apices nachgewiesen werden. Exemplarisch ist ein Apex gezeigt, der zwei dieser Zentren unterhalb des Apikalmeristems aufwies (Abb. 3-25, J).

Eine *WUS*-Expression konnte ebenfalls in Lateralmeristemen einer 49 Tage alten *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Pflanze nachgewiesen werden (Abb. 3-25, K-M). Beobachtet wurde, dass sich die Größe der Lateralmeristeme der Tripelmutante im Vergleich zum Wildtyp unterschied (Long und Barton, 2000; Grbic und Bleecker, 2000). Die Nahaufnahme in Abbildung 3-25 (M) verdeutlicht diese Beobachtung.

3.9 Analysen zur Organisation der Meristemdome in *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Tripelmutanten

In den vorangehenden Kapiteln (3.4.3 und 3.4.4) wurde erstmals die Bildung von neuen Strukturen in Blattachsen der *sc122-1 sc127-1* und *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Mutanten beschrieben. Diese Strukturen traten unter Kurz- und Langtagbedingungen in Erscheinung. Aufgrund der Form wurden diese Strukturen als Meristemdome (MD) bezeichnet. Im nachfolgenden Kapitel wird die detaillierte Charakterisierung der MD vorgestellt. Von besonderem Interesse war ihre Struktur. Sowohl die äußere, als auch die innere Morphologie der MD wurde untersucht.

Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) konnte die Zellstruktur und die Anordnung der äußeren Zellen der MD charakterisiert werden (Abb. 3-26, A). Denkbar war, dass eine Homologie zwischen den MD und dem Apikalmeristem besteht. Diese These wurde mittels REM untersucht. Speziell die Anordnung und Morphologie der äußeren L1-Schicht des MD mit der von vegetativen Wildtyp-Meristemen wurde verglichen. Rasterelektronenaufnahmen vegetativer Wildtyp-Apices von *A. thaliana* zeigten, dass Zellen der L1-Schicht generell eine isodiametrische Form aufweisen und spezifisch angeordnet sind (Clark, 2002).

Für die Untersuchungen mittels REM wurden *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen verwendet, die unter Langtagbedingungen angezogen wurden. Die Durchführung des Experiments erfolgte zu einem Zeitpunkt, an dem die MD in den Blattachsen sichtbar wurden (Kapitel 3.4). Die Ergebnisse der REM zeigten, dass die äußere Schicht der MD aus Zellen unterschiedlicher Zellformen zusammengesetzt war und längliche Zellen überwogen (Abb. 3-26, A). Besonders die Anordnung der Zellen in der Epidermis unterschied sich deutlich von der Anordnung in der L1-Schicht von Wildtyp-Meristemen.

Die Untersuchung der inneren Struktur der MD erfolgte einerseits mittels der REM und der Gefrierbruchtechnik (Abb. 3-26, B-D), andererseits durch die in Kapitel 3.8.1 angewandte histologische Methode der Toluidin-Blau-Färbung (Abb. 3-26, E-F). Die Technik des Gefrierbruchs erlaubt die Darstellung der Zellstrukturen im Inneren eines zu untersuchenden Organs. Im vorliegenden Experiment wurde ein Gefrierbruch an einem MD der Rosettenblattachsel einer Tripelmutante durchgeführt. Diese Pflanze wurde ebenfalls unter Langtagbedingungen kultiviert. Es zeigte sich, dass die Form und Anordnung der Zellen im MD variierten. Bereiche kleiner Zellen (Abb. 3-26, C, Pfeil) wurden in unmittelbarer Nähe zu Ansammlungen großer Zellen gefunden (Abb. 3-26, C, Pfeilspitze). Auffällig war die kreisförmige Anordnung von Zellen in Abb. 3-26 (D, Pfeil). Dieses Zentrum umschloss größere und kleinere Zellen.

Die Struktur des MD wurde ebenfalls in einem histologischen Ansatz untersucht. Für diese Analyse wurden MD von *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen wuchsen, verwendet. In Abbildung 3-26 (E-F) werden zwei Querschnitte unterschiedlicher Schnittebenen desselben MD gezeigt. Dabei repräsentiert (E) einen weiter außen liegenden Schnitt und (F) eine Schnittebene, die ungefähr in der Mitte des MD lag. Die Anordnung der Zellen war sehr ähnlich zu den Strukturen, die mittels Gefrierbruch beobachtet wurden. So konnten in Abbildung 3-26 (E) und (F) zwei kreisförmige Anordnungen von Zellen erkannt werden, die in ihrem Inneren überwiegend kleinere Zellen aufwiesen (E, Pfeil). Diese Zentren waren umgeben von

großen, vakuolisierten Zellen, die besonders deutlich im weiter innen liegenden Schnitt (F, Pfeil) zu erkennen sind.

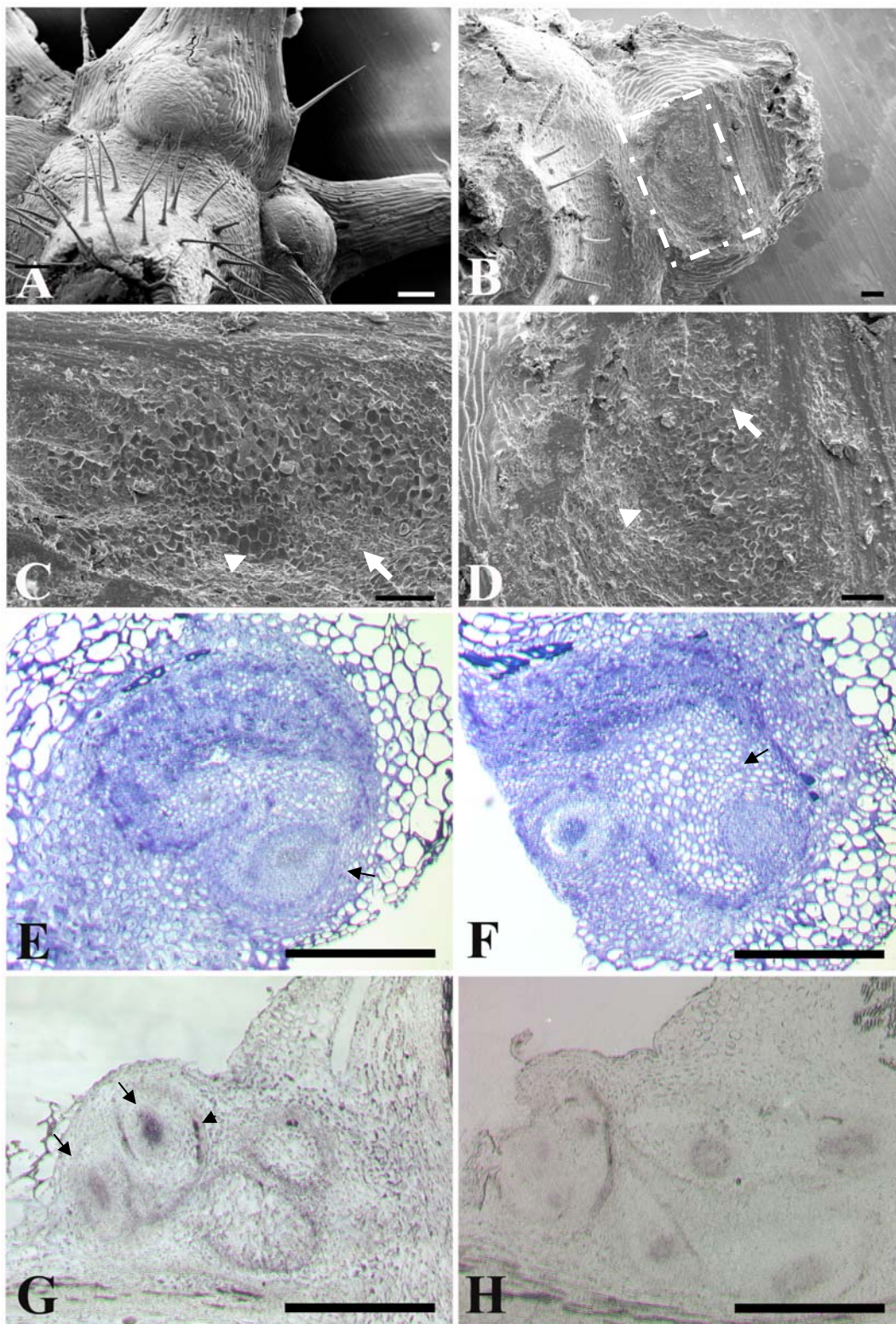


Abb. 3-26 Untersuchungen zur Struktur der Meristemdome in *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen. (A) REM-Aufnahme einer *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Rosette. Die MD entwickelten sich etwa 2 Wochen nach Anthese auf der adaxialen Seite des Blattstiels. (B) REM-Aufnahme vom Gefrierbruch eines MD einer *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanze. (C) und (D) zeigen Nahaufnahmen

des Gefrierbruchs aus **(B)**. Die Aufnahmen in **(C)** und **(D)** verdeutlichen die Organisation der Zellstruktur im MD. Die Zellen variierten in ihrer Größe und Bereiche mit kleinen Zellen (**C**, Pfeil) lagen neben Bereichen mit größeren Zellen (**C**, Pfeilkopf). In **(D)** ist die kreisförmige Anordnung von Zellen dargestellt (Pfeil). Die Pfeilspitze in **(D)** markiert den Bereich größerer Zellen in **(C)**. **(E)** und **(F)** zeigen Querschnitte eines Meristemdoms. Das Gewebe wurde mittels Toluidin-Blau angefärbt. **(E)** zeigt einen Schnitt, der am Beginn des MD vorgenommen wurde und **(F)** repräsentiert den mittleren Bereich des MD. **(G)** und **(H)** zeigen zwei Längsschnitte einer Achsel der Rosettenblattregion, die in RNA-ISH-Experimenten mit einer *STM* Gegensinn-Sonde hybridisiert wurden. **(G)** stellt eine Schnittebene am Beginn des MD dar und **(H)** eine tiefer liegende Ebene. Maßstab: A: 300 µm; B: 200 µm; C, D: 100 µm, E-H: 500 µm.

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Zentren kleiner Zellen ebenfalls eine meristematische Aktivität aufwiesen und eventuell mit den ektopischen Meristemen im Sprossgewebe vergleichbar waren. Für diese Analyse wurden *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Pflanzen im Langtag angezogen und der Bereich der gesamten Rosette nach Erscheinen der MD für die RNA-ISH-Experimente vorbereitet (Kapitel 2.2.12.3). Als Marker der Meristemidentität wurde eine *STM*-Sonde verwendet (Kapitel 3.7.4. und 3.8.3.1).

Die RNA-Hybridisierungen wurden an Längsschnitten, die die Achselregion repräsentierten, durchgeführt (Abb. 3-26, G-H). Für die Ansammlungen kleiner Zellen in den MD konnte tatsächlich ein meristematischer Charakter mittels der *STM*-Sonde nachgewiesen werden. So sind in Abbildung 3-26 (G) zwei dieser Zentren durch die *STM*-Sonde markiert (Pfeil). Sie befinden sich in einer aufgewölbten Struktur, dem MD, in der Achsel. Anders als für die ektopischen Meristeme des Sprosses (Kapitel 3.8.3.1), scheint für die ektopischen Meristeme im MD eine deutlichere Abgrenzung vom umgebenden Gewebe vorzuliegen (Abb. 3-26, G, Pfeilspitze). Diese Abgrenzung der ektopischen Meristeme im MD war ebenfalls in den histologischen Schnitten in (E) und (F) der Abbildung 3-26 zu erkennen und möglicherweise auch durch die kreisförmige Struktur in (D) (Abb. 3-26, Pfeil) gekennzeichnet. Möglicherweise handelt es sich um Zellen der sogenannten „shell zone“ (Grbic und Bleecker, 2000). Diese säulenförmigen Zellen umgeben die ersten Zellansammlungen in einer Blattachsel. In einem späteren Stadium der Lateralmeristementwicklung sind die „shell zone“-Zellen nicht mehr zu erkennen (Grbic und Bleecker, 2000).

Eine weitere interessante Beobachtung konnte in tiefer liegenden Schnitten durch die Achsel, in (H) dargestellt, gemacht werden (Abb. 3-26). Es zeigte sich, dass die durch *STM* markierten Zentren nicht nur auf den Bereich des MD beschränkt waren (G), sondern auch im Sprossgewebe vorkamen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen aus Kapitel 3.8.3.1.

Die Ergebnisse zur Charakterisierung der Meristemdomen deuten darauf hin, dass die Entstehung der MD und die Entstehung der ektopischen Meristeme im Spross dieselbe Ursache haben könnten.

4. Diskussion

4.1 *eo15* verstärkt den *las-4*-Verzweigungsdefekt und ist mit Chromosom 2 gekoppelt

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit (Kap. 3.1) wurde die *eo15*-Mutante untersucht und der *eo15*-Locus auf Chromosom 2 kartiert. Die phänotypische Charakterisierung (Clarenz, 2004) zeigte, dass der *eo15*-Phänotyp, im Gegensatz zum *las-4*-Phänotyp, nur unter Kurztag-bedingungen auftritt. Eine ähnliche Abhängigkeit von der Tageslänge wurde auch für andere *eo*-Mutanten (Clarenz, 2004) und die *rax*-Mutanten (Müller, 2005) beschrieben. In der *eo15*-Mutante wird der *las-4*-Verzweigungsdefekt besonders in der reproduktiven Phase verstärkt (Clarenz, 2004).

Die Kartierung des *eo15*-Locus erfolgte in einer F₂-Kartierungspopulation. Diese wurde durch die Kreuzung einer homozygoten *eo15*-Mutante im *las-4*-Hintergrund zu dem Ökotyp *Ler* generiert, da das *las-4*-Allel den genetischen Hintergrund Col-0 aufwies. Auskreuzungsexperimente haben gezeigt, dass *eo15*-Pflanzen ohne Mutation des *LAS*-Gens keinen eigenen mutanten Phänotyp ausbilden (Clarenz, 2004). In der F₂-Kartierungskreuzung wurde daher von einer 9:3:3:1 Verteilung der Phänotypen ausgegangen. Der *las-4*-Verzweigungsdefekt wird nur in einer homozygoten *las-4*-Mutante sichtbar. Es wurde daher angenommen, dass 12 von 16 F₂-Pflanzen ein Wildtypverzweigungsmuster aufwiesen. 3 von 16 Pflanzen sollten den *las-4* und 1 von 16 Pflanzen den *eo15*-Phänotyp ausprägen. Eine Analyse der Phänotypen von 541 F₂-Pflanzen zeigte, dass die erwarteten Phänotypenverhältnisse nicht auftraten. Die Anzahl an Pflanzen, die einem *las-4*-Phänotyp zugeordnet werden konnten, war geringer als erwartet und die Zahl der *eo15*-phänotypischen Pflanzen höher. Zusätzlich traten Pflanzen in der F₂-Kartierungspopulation auf, die nur eine leichte Verstärkung des *las-4* Phänotyps zeigten und als intermediäre Phänotypen klassifiziert wurden. Die Anzahl der Pflanzen, die diesen intermediären Phänotyp zeigten, entsprach ungefähr der Differenz von erwarteten und in der F₂-Kartierungspopulation gefundenen *las-4*-Pflanzen. Dies deutet darauf hin, dass das *eo15*-Allel möglicherweise auch in heterozygoter Form verstärkend auf den *las-4*-Verzweigungsdefekt wirkt.

Die anschließenden molekularen Untersuchungen zur Kartierung des *eo15*-Locus mit SSLP- und CAPS-Markern wurden an 42 F₂-Pflanzen mit *eo15*-Phänotyp durchgeführt. Der *eo15*-Locus sollte zu 100 Prozent mit einem Col-0-Marker kosegregieren. Es wurde gefunden, dass der *eo15*-Phänotyp mit den Markern *nga1126* und *nga361* von Chromosom 2 zu 80 Prozent kosegregierte. Zusätzlich zeigte sich aufgrund des *las-4*-

Allels eine vollständige Kosegregation des *eo15*-Phänotyps mit dem Marker nga280 des Chromosoms 1. Außerdem segregierten zu 70 Prozent *Ler*-Allele für die Marker CTR1 und *ciw8* des Chromosoms 5 mit dem *eo15*-Phänotyp. Möglicherweise befindet sich auf dem oberen Arm des Chromosoms 5 ein QTL, der die Verzweigung in einem *las-4*-Hintergrund negativ beeinflusst. In Arbeiten von Clarenz (2004) wurde bei der Kartierung von *eo13* ein ähnlicher Einfluss des *Ler*-Hintergrunds auf den *las-4*-Phänotyp gefunden.

Der mögliche Einfluss eines QTLs auf die Verzweigung wurde in einer Segregationsanalyse mit ausgewählten *eo15* phänotypischen-Pflanzen der F2-Kartierungspopulation untersucht. Nachkommen von F2-Pflanzen, die heterozygot für die beiden Marker nga1126 und nga361 auf Chromosom 2 waren, zeigten eine Segregation der *eo15* und *las-4*-Phänotypen. Im Gegensatz dazu trat keine Segregation der Phänotypen unter Nachkommen von *eo15*-phänotypischen F2-Pflanzen auf, die für die Marker nga1126 und nga361 homozygot Col-0 waren. Diese Ergebnisse waren ein weiterer Hinweis, dass der *eo15*-Locus auf Chromosom 2 lokalisiert ist. Außerdem zeigte sich, dass einige der F2-Pflanzen, die heterozygot bezüglich des *eo15*-Locus waren, den *eo15*-Phänotyp ausbildeten. In diesen Pflanzen hatte möglicherweise der Einfluss des QTL im *Ler*-Hintergrund den *las-4*-Phänotyp verstärkt.

Durch die Etablierung von Rückkreuzungspopulationen für *eo15* wurde der Einfluss des *Ler*-Hintergrunds auf die *las-4*-Mutation verringert. Die Segregationsanalysen einer F2-Population der ersten Rückkreuzung (*eo15*-BC1F2) zeigten, dass durch eine Verminderung der *Ler*-Allele eine Verteilung der Phänotypen auftrat, die den Erwartungen einer 3:1 Segregation nahezu entsprach. Auch eine zweite Rückkreuzungspopulation (*eo15*-BC2F1) wurde innerhalb dieser Arbeit generiert. Diese Population soll in weiterführenden Experimenten zur Feinkartierung des *eo15*-Locus auf Chromosom 2 genutzt werden.

Alternativ können „Chromosomal Substitution“-Linien verwendet werden (Koumproglou *et al.*, 2002). Diese Linien sind durch Kreuzungen zwischen den beiden Ökotypen *Ler* und Col-0 generiert worden. In ihnen ist jeweils ein gesamtes Col-0-Chromosom durch ein gesamtes *Ler*-Chromosom ersetzt, die anderen vier Chromosomen stammen aber weiterhin aus dem Col-0-Hintergrund. Da nur ein einzelnes Chromosom aus *Ler* in diesen Linien vorliegt, kann in einer Kreuzung der *eo15*-Mutante mit einer Substitutionslinie des Chromosoms 2 der Einfluss von *Ler*-Allelen der anderen Chromosomen auf den *las-4*-Phänotyp ausgeschlossen werden.

Das Vorkommen eines *Ler*-QTLs, der den *las-4*-Phänotyp verstärkt, bietet außerdem die Möglichkeit, weitere Regulatoren der Seitentriebentwicklung im *Ler*-Genom zu identifizieren.

4.2 Funktion der *HAM*-ähnlichen Gene bei der Anlage von Seitentrieben und beim Erhalt des Apikalmeristems in *A. thaliana*

4.2.1 Phänotypische Analysen von Insertionsmutanten zeigen den Einfluss von *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* auf die Entwicklung von Seitentrieben

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der *HAM*-ähnlichen Genen aus *A. thaliana* hinsichtlich der Etablierung von Seitentrieben untersucht (Kap.3.2). Die Charakterisierung der *35S::mir171*-Linie, die einen Verzweigungsdefekt in der vegetativen und reproduktiven Phase der Entwicklung aufwies, lieferte Hinweise dafür, dass die Anlage der Seitentriebe durch die Zielgene der *miR171* reguliert wird. Von den fünf *HAM*-ähnlichen Genen in *A. thaliana* weisen nur *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* eine *miR171*-Erkennungssequenz auf.

Die Identifizierung von Insertionsmutanten für die Gene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* ermöglichte eine detaillierte Charakterisierung der Funktionen dieser Gene bei der Anlage von Seitentrieben (Kap. 3.3). Dabei zeigte die Einzelmutante *sc127-1* bei der Kultivierung unter Kurztagbedingungen eine Reduktion der Verzweigung in den Stängel- und Rosettenblattachseln. Bei der Detailanalyse der Rosettenblattachseln von *sc127-1*-Pflanzen fiel auf, dass die Unterdrückung der Seitentriebanlage in der vegetativen Phase einem basipetalen Gradienten folgte und die Bildung von Seitentrieben in den ältesten Rosettenblattachseln im Vergleich zum Wildtyp nahezu unverändert war. Im *A. thaliana* Wildtyp folgt die Entwicklung von Achselmeristemen in der vegetativen Phase einem akropetalen Gradienten (Hempel und Feldman, 1994; Grbic und Bleecker, 1996). Dieser Gradient scheint in der *sc127-1*-Mutante, im Gegensatz zur *rax1-1*-Mutante (Müller *et al.*, 2006), nicht beeinträchtigt zu sein. Die Reduktion der Anlage sekundärer Triebe der *rax1-1*-Mutante folgt einem akropetalen Gradienten. In älteren Rosettenblattachseln ist die Anlage von Meristemen unterdrückt (Müller, 2005).

Für *SCL27* konnte bei der Anzucht der Pflanzen unter Kurztagbedingungen außerdem eine Funktion bei der Bildung von lateralen Trieben innerhalb der reproduktiven Phase beobachtet werden, da in *sc127-1*-Pflanzen in etwa 25 Prozent der untersuchten Achseln kein Seitentrieb gebildet wurde. Die Analyse der zwei Einzelmutanten *sc16-1*

und *sc/22-1* hinsichtlich einer Abweichung vom Wildtyp-Verzweigungsmuster zeigte, dass ein Ausfall der Genprodukte von *SCL6* oder *SCL22* keine Auswirkung auf die Anlage von Seitentrieben hatte. Vermutlich ist dies durch eine funktionelle Redundanz zwischen den Genen *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* zu erklären. Erst die Erzeugung aller drei möglichen Doppelmutanten und einer Tripelmutante zwischen den Insertionslinien *sc/6-1*, *sc/22-1* und *sc/27-1* deckte eine Rolle aller drei Proteine bei der Regulation der Seitentriebentwicklung auf (Kap. 3.4).

Eine Funktion von *SCL6* innerhalb der Seitentriebentwicklung zeigte sich in der phänotypischen Charakterisierung der Doppelmutante *sc/6-1 sc/27-1*. Bei der Kombination beider Allele wurde der *sc/27-1*-Verzweigungsdefekt durch das *sc/6-1*-Allel verstärkt. Seitentriebe fehlten auch in Achseln, die früh in der vegetativen Entwicklungsphase angelegt wurden. Die Unterdrückung der Seitentriebbildung nahm akropetal ab. Auffällig war, dass ein Verlust der Genaktivitäten von *SCL6* und *SCL27* zum Teil auch zu einer frühzeitigen Termination von Lateralmeristemen führte. Besonders deutlich trat dieses Merkmal während der reproduktiven Phase auf. In den ältesten Stängelblattachseln fanden sich nur die ersten Blätter des sekundären Triebes. Die Seitentriebe folgender Blattachseln bildeten einige Blätter, bevor das Meristem des sekundären Triebes terminierte. In Achseln jüngerer Blätter bildeten sich normale Seitentriebe.

Auch während der vegetativen Entwicklung der *sc/6-1 sc/27-1*-Pflanzen konnten unterschiedliche Identitäten der lateralen Triebe beobachtet werden. Allerdings folgten diese Veränderungen einem basipetalen Gradienten, bei dem die Identitäten der Seitentriebe vorwiegend in den jüngsten Rosettenblattachseln verändert waren. Der überwiegende Anteil der untersuchten Achseln bildete keinen Seitentrieb. Der Verzweigungsdefekt der *sc/6-1 sc/27-1*-Linie trat unter Langtagbedingungen nicht in Erscheinung. Möglicherweise konnte unter diesen Bedingungen *SCL22* den Ausfall von *SCL6* und *SCL27* kompensieren.

Eine Phänokopie der *35S::mir171*-Linie konnte nur bei einer Kombination der Allele *sc/22-1* und *sc/27-1* erzielt werden. Ähnlich der *35S::mir171*-Linie war in dieser Doppelmutante die Anlage lateraler Triebe entlang der gesamten Sprossachse bei der Kultivierung unter Langtagbedingungen stark reduziert. Auch in der *sc/22-1 sc/27-1*-Doppelmutante zeigte sich eine graduelle Änderung der Achselmeristemidentitäten entlang der Sprossachse, die in unterschiedlicher Stärke auf die Fähigkeit des Meristemerhalts in sekundären Trieben wirkte.

Die Charakterisierung der Insertionsmutanten zeigte, dass die drei untersuchten *SCL*-Gene in unterschiedlichem Maße die Etablierung von Seitentrieben entlang der Sprossachse beeinflussen. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für die einzelnen *RAX* Gene gemacht, für die ebenfalls unterschiedliche Aktivitäten in den verschiedenen Entwicklungsphasen beobachtet wurden (Müller, 2005). Bei der Kombination der Allele *sc16-1* und *sc127-1* wurde deutlich, dass die Entwicklung der Seitentriebe in der frühen vegetativen Phase durch *SCL6* positiv beeinflusst wird. *SCL27* hat zwar während der gesamten vegetativen Phase eine fördernde Wirkung auf die Entwicklung sekundärer Triebe, besonders ausgeprägt ist diese aber in der späten vegetativen Phase. Innerhalb der reproduktiven Phase stimuliert *SCL27* die Ausbildung lateraler Sprosse vornehmlich in den jüngsten Blattachsen. Die Aktivität von *SCL22* überschneidet sich mit der von *SCL27*. Eine Kombination beider Verlustallele verstärkte den *sc127-1*-Phänotyp in beiden Entwicklungsphasen. Die unterschiedliche Ausprägung der Phänotypen lässt darauf schließen, dass *SCL22* und *SCL27* gegenüber *SCL6* eine zentralere Funktion in der Entwicklung von Seitentrieben übernehmen. Die Charakterisierung der Einzelmutanten *sc122-1* und *sc127-1* zeigte, dass die fehlende *SCL27*-Genaktivität nicht vollständig durch *SCL22* kompensiert werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass *SCL27* von allen drei untersuchten *SCL*-Genen die wichtigste Rolle bei der Seitentriebentwicklung spielt. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass der Verzweigungsdefekt der *35S::mir171*-Linie im Wesentlichen durch die Inaktivierung der Zielgene *SCL22* und *SCL27* verursacht wird, da das *sc16-1*-Allel den Phänotyp der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante nur leicht verstärkte.

Ein Vergleich der Phänotypen der *sc1*-Mutanten mit denen anderer Verzweigungsmutanten zeigte, dass das Verzweigungsmuster der *sc127-1*-Pflanzen in kurzen Photoperioden dem des Zürich-0 (Zu-0)-Ökotyps glich (Kalinina *et al.*, 2002). Zu-0-Pflanzen sind ebenfalls durch eine Reduktion der Seitentriebbildung in den jüngsten Blattachsen innerhalb der vegetativen Phase und den ältesten Blattachsen innerhalb der reproduktiven Phase gekennzeichnet. Zu-0 gehört zu den spät blühenden Ökotypen, die sensitiv auf die Veränderung des Blühzeitpunkts durch Vernalisierung reagieren. Eine Verschiebung des Blühzeitpunkts, durch eine Reduktion der Länge der vegetativen Phase, resultiert in einer Aufhebung des Verzweigungsdefekts (Kalinina *et al.*, 2002). Ähnliches konnte auch in Pflanzen der *sc127-1*-Einzelmutante und der *sc16-1 sc127-1*-Doppelmutante beobachtet werden, in denen sich unter Langtagbedingungen keine Änderung der Sprossarchitektur im Vergleich zum Wildtyp zeigte. Möglicherweise ist in der Zu-0-Pflanze ein Gen desselben Signalwegs betroffen. Eine molekulare Analyse der drei *SCL*-Gene in Zu-0 könnte darüber Auskunft geben, ob die Expressionen der Gene in diesem Ökotyp verändert sind.

Auch für andere Mutanten hängt die Ausprägung eines Verzweigungsdefekts von der Photoperiode ab. So treten beispielsweise die mutanten Phänotypen der *rax1 rax2 rax3*-Tripelmutante (Müller, 2005) und der *eol*-Mutanten (Clarenz, 2004) unter langen Photoperioden nicht in Erscheinung, sondern werden vermutlich durch die Aktivität redundanter Signalwege verdeckt.

4.2.2 SCL-Gene regulieren den Erhalt des Apikalmeristems unter Kurztagbedingungen

In der vorliegenden Arbeit konnte für einige *scl*-Mutanten neben einer Termination der Lateralmeristeme auch eine Termination des Apikalmeristems festgestellt werden (Kap. 3.4.5). Dieser Phänotyp trat erstmals in der *35S::mir171*-Linie bei der Anzucht in kurzen Photoperioden in Erscheinung (Kap. 3.2.1). Interessanterweise konnte eine Phänokopie nur durch die Kombination der beiden Allele *scl22-1* und *scl27-1* erzielt werden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass, neben dem Erhalt der Lateralmeristeme, ebenfalls die meristematische Aktivität des Apikalmeristems durch SCL22 und SCL27 reguliert wird. Die beiden Proteine verhalten sich auch hier redundant zueinander, da weder die Einzelmутanten noch die jeweilige Kombination mit dem Allel *scl6-1* einen vergleichbaren Phänotyp aufwies.

In verschiedenen Ansätzen wurden mögliche Ursachen für das Auftreten der Phänotypen der *35S::mir171*-Linie, der *scl22-1 scl27-1*-Doppelmutante und der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante in langen und kurzen Photoperioden untersucht. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Blühinduktion und der Fähigkeit, das Apikalmeristem aufrechtzuerhalten (Kap. 3.5). So führte zum Beispiel die beschleunigte Blühinduktion durch GA-Applikation in kurzen Photoperioden bei der *35S::mir171*-Linie zu einer verminderten Anzahl an Pflanzen, die eine Termination des Apikalmeristems aufwiesen. Das Phytohormon GA wirkt positiv auf den Zeitpunkt der Blütenbildung (Zeevaart, 1983) und dieses Experiment war ein erster Hinweis, dass die Länge der vegetativen Phase einen Einfluss auf die Ausprägung des Terminationsphänotyps haben könnte.

In einem weiteren Experiment, in dem *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten für unterschiedlich lange Intervalle in kurzen Photoperioden angezogen wurden, bevor sie unter Langtagbedingungen bis zur Blütenbildung der Kontrollpflanzen weiterkultiviert wurden, konnte außerdem eine kritische Länge von etwa 41 Tagen bestimmt werden, nach der die Termination des Apikalmeristems durch Induktion mit langen Photoperioden nicht mehr aufgehoben werden konnte.

Die Kombination der *35S::miR171*-Linie mit einer *co*-Insertionslinie (*CO* ist ein Integrator des photoperiodischen Signalwegs; Puterill, 1995) war ein weiterer Ansatz, die Ursache für den Verlust der meristematischen Aktivität zu analysieren. Eine Mutation im *CO* Gen führt zu einer verspäteten Blühinduktion und einer Verlängerung der vegetativen Phase unter Langtagbedingungen. Das Auftreten des Terminationsphänotyps bei der Kultivierung von *35S::miR171 co*-Pflanzen unter Langtagbedingungen war deshalb ein weiterer Hinweis, dass die Länge der vegetativen Phase und der Zeitpunkt der Blühinduktion entscheidend für den Erhalt des Meristems sind (Kap. 3.5.2).

Der Phänotyp der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten war bei der Kultivierung in kurzen Photoperioden mit dem der *ham*-Mutante vergleichbar. Eine Mutation im homologen Gen der drei *SCL*-Gene führt ebenfalls zu einer Arretierung des Wachstums während der vegetativen Phase, welche durch eine terminale Differenzierung des Apikalmeristems bedingt ist (Stuurman *et al.*, 2002). In der *ham*-Mutante kann die meristematische Aktivität wegen des Ausfalls von HAM nicht aufrechterhalten werden. Seitentriebe werden in den Achseln der Mutante nur vereinzelt angelegt und sind ebenfalls durch ein Termination charakterisiert (Stuurman *et al.*, 2002). Die Phänokopie des *ham*-Merkmals durch die *scl22-1 scl27-1* Doppelmutante und die Tripelmutante lässt vermuten, dass *SCL22*, *SCL27* und *HAM* ähnlich auf den Erhalt der Meristemaktivität wirken.

Ein wesentlicher Unterschied der Terminationsphänotypen der *scl22-1 scl27-1* oder *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten zu anderen Terminationsmutanten ist das späte Auftreten der Termination des Apikalmeristems. In anderen bekannten Terminationsmutanten führen Defekte des Apikalmeristems zum Teil zur Letalität oder zu einer sehr frühen Arretierung des Wachstums. Rezessive Mutationen im *STM*-Locus führen beispielsweise zu einem Verlust der Fähigkeit, das Meristem zu erhalten. Eine Termination des Meristems tritt bereits im Keimlingsstadium auf (Barton und Poethig, 1993). Das Homeobox-Protein *STM* ist während der Embryogenese exprimiert und eine *STM*-Expression markiert im vegetativen Apex meristematische Zellen (Long *et al.*, 1996). Ein dominantes Allel des *DORNROSCHE/ENHANCER OF SHOOTREGENERATION* (*DRN/ESR1*)-Locus, *drn-D*, führt ebenfalls zu einer Termination des Apikalmeristems. Veränderungen im Meristem der *drn-D*-Pflanzen sind ebenfalls im Keimlingsstadium sichtbar (Kirch *et al.*, 2003).

Die Termination des Apikalmeristems in der *scl22-1 scl27-1* oder der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutante kann auch vom Terminationsphänotyp der *wus*-Mutante unterschieden werden. *WUS* kodiert für ein Homeobox-Protein, das mittels der Proteine *CLV1* und

CLV3 die Stammzellpopulation im Meristem reguliert (Brand *et al.*, 2000). Eine Mutation im *wus*-Locus prägt sich ebenfalls früh in der Entwicklung der Pflanze aus. Darüber hinaus zeigte eine Kombination der *ham*-Mutation mit *terminator* (*ter*), einem mutanten Allel des *WUS*-orthologen Gens in Petunie, eine Addition der beiden Phänotypen. In der frühen Entwicklungsphase war die Doppelmutante durch ein „stop and go“ Wachstum gekennzeichnet. Dieses ist charakteristisch für eine Mutation im *WUS*-Locus. Der *ham*-Phänotyp in der *ham ter*-Doppelmutante bildete sich im Vergleich zur *ham*-Einzelmutante erst später in der Entwicklung aus (Stuurman *et al.*, 2002).

Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass in den *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten eine Anzucht in kurzen Photoperioden zu einer Limitierung des Wachstumspotenzials führt. Wird eine kritische Länge unter Kurztagbedingungen überschritten, tritt eine Beendigung des Wachstums ein. Die Daten deuten außerdem darauf hin, dass unter Langtagbedingungen möglicherweise ein Faktor vorhanden ist, der die Termination des Apikalmeristems unterdrückt. Dieser Faktor liegt während der vegetativen Phase vermutlich nur in limitierenden Konzentrationen vor. Er könnte in einem *ENHANCER*-Screen identifiziert werden. Neben Genen, die für Regulatoren des Blühsignalwegs kodieren, könnten in diesem Screen auch Mutationen identifiziert werden, die in einem *scl22-1 scl27-1*-Hintergrund zur Ausbildung eines Terminationsphänotyps in langen Photoperioden führen.

4.2.3 Transkripte der *HAM*-ähnlichen Gene von *A. thaliana* akkumulieren im Apikalmeristem und in den Lateralmeristemen

Die Kenntnis der Expressionsmuster der *SCL*-Gene sollte helfen, ihre Funktionen bei der Entwicklung von lateralen Trieben und beim Erhalt des Apikalmeristems aufzudecken. Für einige Mutanten, die einen Defekt bei der Anlage von Seitentrieben haben, konnte die Expressionsdomäne mit dem Phänotyp korreliert werden. So ist beispielsweise das *LAS*-Gen im axilären Bereich exprimiert (Greb, 2003). Der korrespondierende mutante Phänotyp, der in vegetativen Blattachsen durch Veränderung der Sprossarchitektur zur Ausprägung kommt, ist auf einen Verlust der meristematischen Identität von Zellen in der Achsel zurückzuführen. Ähnlich ist der Phänotyp der *rax1 rax2 rax3*-Tripelmutante zu beschreiben. *RAX1* und *RAX3* sind im zentralen Bereich der interprimordialen Region exprimiert (Müller, 2005). Ein Ausfall dieser Genprodukte führt zu einer Reduktion der Verzweigung.

SCL22- und *SCL27*-Transkripte wurden sowohl im vegetativen, als auch im reproduktiven Apex in Infloreszenz- und Blütenmeristemen detektiert und zeigten ein

vergleichbares Muster (Kap. 3.7). Darüber hinaus fand sich auch eine Expression in den vaskulären Leitbahnen des Sprosses und der Blätter. Die Expression der beiden Gene im Apikalmeristem und der Terminationsphänotyp von *sc122-1 sc127-1* und *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Mutante lässt vermuten, dass die meristematische Aktivität der Zellen in kurzen Photoperioden durch SCL22 und SCL27 reguliert wird.

SCL22 und *SCL27* sind aus einer rezenter Genduplikation hervorgegangen (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Bolle, 2004). Nach einer Duplikation übernimmt in der Regel eines der Gene eine neue Funktion. Ist dies nicht der Fall, geht die Funktion eines Gens verloren oder seine Expressionsstärke wird verringert (Duarte *et al.*, 2006). Dies könnte eine Ursache für die unterschiedlichen Expressionslevel der Gene *SCL22* und *SCL27* sein. Die verschiedenen Expressionsstärken erklären möglicherweise auch die Unterschiede beim Ausfall von SCL22 oder SCL27, da nur die *sc127-1*-Einzelmutante einen Verzweigungsdefekt zeigte. Eine Verschiebung der Expressionsstärken der Transkriptionsfaktoren *CUC1* und *CUC2*, die ebenfalls aus einer Genduplikation hervorgegangen sind, ist mit einer zentraleren Rolle von *CUC2* in der Entwicklung der Pflanze verbunden (Hibara *et al.*, 2006).

Ein Einfluss der *SCL22* und *SCL27* Genprodukte auf die Sprossarchitektur konnte in der *sc122-1 sc127-1*-Verlustmutante gezeigt werden. Der Phänotyp der Doppelmutante ließ vermuten, dass die Genprodukte von *SCL22* und *SCL27* im Col-0-Wildtyp axilär exprimiert sind. Mittels RNA-ISH-Experimenten konnte eine zu *REV* (Otsuga *et al.*, 2001) ähnliche Expressionsdomäne der beider Gene in Lateralmeristemen detektiert werden. Ähnlich dem *REV*-Transkript wurden *SCL22* und *SCL27* zu einem Zeitpunkt in Lateralmeristemen detektiert, der dem Stadium 3 nach Long und Barton (2000) entsprach (Kap. 3.7.1 und Kap. 3.7.2).

REV gehört zur Gruppe der HD-ZIP-III-Transkriptionsfaktoren. Eine *rev*-Mutation im Col-0-Hintergrund ist durch eine Unterdrückung der Seitentriebbildung gekennzeichnet (Zhong und Ye, 1999). In Arbeiten von Greb (2003) konnten in Achseln der *las-4*-Pflanzen keine *REV*-Transkripte mehr nachgewiesen werden. In parallel untersuchten Apices des Col-0-Wildtyps waren diese aber ab dem P17 deutlich zu erkennen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *REV* kein Initiator der Lateralmeristembildung ist, sondern auf die Aktivität des *LAS*-Gens angewiesen ist (Greb, 2003). Es ist denkbar, dass *REV* ein Regulator der Gene *SCL22* und *SCL27* ist und direkt oder indirekt auf die Expression dieser Gene in sich entwickelnden Lateralmeristemen wirkt. Andererseits könnte die Expression von *REV* im Lateralmeristem auch durch *SCL22* und *SCL27* reguliert werden. Eine mögliche Abhängigkeit zwischen der Expression von *REV* und der

Expression von *SCL22* und *SCL27* soll in einer *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante und einer *rev*-Mutante untersucht werden.

Auch in Apikalmeristemen und im vaskulären System konnte für *SCL22* und *SCL27* ein zu *REV* vergleichbares Expressionsmuster (Zhong und Ye, 1999; Otsuga *et al.*, 2001) gefunden werden. Mutationen im *REV*-Locus führten zu Veränderungen des vaskulären Systems (Talbert *et al.*, 1995; Zhong und Ye, 1999). Eine dominante Mutation im *REV*-Locus, *amphivasal (amp1)*, führt zu einer Radialisierung der Leitbündel und zu ektopischen Meristemen am Haupttrieb (Zhong und Ye, 2004). Eine Fehlexpression des HD-ZIP-III Gens *PHAVOLUTA (PHV)* in Tabak führte zu ektopischen Meristemen entlang des Stammes und zu einer Fehlorientierung der Leitbündel, die sich basal gerichtet an der inneren Seite des Stammes entwickelten. Die Fehlorientierung der Ansatzpunkte der Schoten in der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante könnte eine ähnliche Ursache haben und auf einem Defekt der Leitbündelorganisation beruhen. Ein solcher Defekt könnte auch die Ursache der veränderten Phyllotaxis der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante sein. Es ist denkbar, dass die Proteine *SCL22* und *SCL27*, ähnlich wie *REV*, die Struktur des vaskulären Systems beeinflussen. Defekte in den Leitbündeln könnten beispielsweise dazu führen, dass für die Entwicklung der Lateralmeristeme entscheidende Signalstoffe nicht an ihren Wirkungsort gelangen. Ein solcher Signalstoff könnte zum Beispiel Auxin sein. Eine Funktion von Auxin bei der Anlage lateraler Meristeme wurde in einer Kombination der *las-4*-Mutation mit dem *axr1-12*-Allel deutlich (Greb *et al.*, 2003). Mögliche Veränderungen der Leitbündelstrukturen in der *sc122-1 sc127-1*-Doppelmutante und der *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Tripelmutante werden in einer Kooperation mit T. Greb (GMI, Wien) untersucht.

Eine Funktion von *SCL6* bei der Etablierung der Sprossarchitektur wurde in einer Kombination des *sc16-1*-Allels mit *sc127-1* deutlich. Die Expression von *SCL6* fand sich in Wildtyppflanzen in der interprimordialen Region junger Primordien des vegetativen Apex und in den Achseln älterer Blätter während der reproduktiven Phase (Kap. 3.7.3). Dieses Expressionsmuster stand im Einklang mit dem Verzweigungsdefekt der *sc16-1 sc127-1*-Pflanzen. Die frühe axiläre Expression von *SCL6* lässt darauf schließen, dass *SCL6*, anders als *SCL22* und *SCL27*, in einem früheren Entwicklungsschritt der Lateralmeristembildung benötigt wird. *SCL6*-Transkripte wurden ebenfalls in Blütenprimordien, der interprimordialen Region der Sepalen und in den Karpellen detektiert.

Beim Vergleich von *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* aus *A. thaliana* mit *HAM* aus Petunie ist erkennbar, dass die Verwandtschaft von *SCL6* zu *HAM* näher ist, als die von *SCL22* und *SCL27* zu *HAM*. Eine Überschneidung der Expressionsdomänen von *HAM* in Petunie und

SCL6 in *A. thaliana* trat aber nur in den Blütenprimordien auf. Der korrespondierende mutante Phänotyp der *ham*-Mutante ist durch eine Reduktion der Blütenorgane erkennbar (Stuurman *et al.*, 2002). Eine entsprechende Veränderung in der *scl6-1*-Mutante war nicht zu beobachten. *HAM* wird innerhalb der vegetativen und der reproduktiven Phase exprimiert (Stuurman *et al.*, 2002). Die Analysen der Expressionsdomänen von *SCL22* und *SCL27* zeigten, dass diese ein ähnliches Expressionsmuster in *A. thaliana*-Apices aufwiesen, wie *HAM* in Petunie. Die Expression der Gene *SCL22* und *SCL27* überlappte ebenfalls im provaskulären System von Blatt- und Blütenprimordien mit der des *HAM* Gens. Im Gegensatz zu *HAM*, dessen transkriptionelle Aktivität auf die L3-Schicht im Meristem beschränkt ist (Stuurman *et al.*, 2002), konnten *SCL22*- und *SCL27*-Transkripte allerdings auch in der L1- und L2-Schicht gefunden werden (Kap. 3.7.1 und Kap. 3.7.2).

Die Überschneidung der Expressionsdomänen von *SCL22* und *SCL27* mit der von *HAM* und der vergleichbare Terminationsphänotyp von Verlustmutanten lässt auf eine ähnliche Funktion beim Erhalt der meristematischen Identität schließen. Die Daten deuten darauf hin, dass *SCL22* und *SCL27* die orthologen Gene zu *HAM* aus Petunie sind, obwohl *SCL6* eine größere Ähnlichkeit zu *HAM* aufweist.

4.2.4 Die Expressionsmuster von *miR171a* und den Zielgenen *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* zeigen nur wenige Überschneidungen

Die Transkripte der Gene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* haben eine Zielsequenz für *miR171*. Für *SCL6* und *SCL22* wurde eine Regulation durch *miR171* experimentell überprüft und Abbauprodukte der *SCL6*- und *SCL22*-Transkripte konnten nachgewiesen werden (Llave *et al.*, 2002). Die Relevanz dieser Regulation während der Entwicklung von *A. thaliana* kann durch Informationen zur Expressionsdomäne von *miR171* bestimmt werden. Studien zur Expression anderer miRNA Gene und ihrer Zielgene haben gezeigt, dass die Expressionsdomänen sich häufig überlappen (Laufs *et al.*, 2004; Nikovics *et al.*, 2006) oder durch den Abbau der Zieltranskripte ein komplementäres Expressionsmuster ergeben (Mallory *et al.*, 2004). Die Funktion einiger miRNA Gene besteht in einer Feinregulierung der Transkriptmengen und einer Determinierung der Expressionsdomäne der Zielgene (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Peaucelle *et al.*, 2007).

Parizotto *et al.* (2004) konnten durch die Verwendung eines *miR171* sensitiven GFP-Konstrukts das Expressionsmuster von *miR171* untersuchen. Außerdem wurde die Transkriptionsdomäne von *miR171a* indirekt durch eine Fusion des *miR171a*-Promotors mit dem ORF des *GFP* Gens untersucht. Die Expression von *miR171a* in Blättern und im

Stängel war besonders in Stomatazellen sehr hoch und zeigte sich schwächer in Mesophyllzellen der Blätter. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Überschneidung der Expressionsdomänen der drei *HAM*-ähnlichen Gene mit *miR171a* nur auf Organe der Blüte zutraf (Kap. 3.7). *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* wurden in der Blüte im Gynoezeum detektiert. Die Promotoraktivität von *miR171a* konnte ebenfalls im Gynoezeum detektiert werden. Darüber hinaus konnte in diesen Organen die Aktivität der *miR171a* nachgewiesen werden (Parizotto *et al.*, 2004). Eine Expression von *miR171*-Transkripten in den Leitbündeln wurde von Parizotto *et al.* (2004) anhand dieser Methode nicht nachgewiesen.

Die Expressionsmuster von *miR171* in Tabak (Válóczi *et al.*, 2006) und von *SCL22* und *SCL27* in *A. thaliana* sind sehr ähnlich. In Tabak konnten *miR171*-Transkripte im vaskulären System, im Meristem und in Blüten gefunden werden. Die fehlende Übereinstimmung der Expressionsmuster von *SCL22* und *SCL27* mit *miR171a* in *A. thaliana* ist möglicherweise durch eine Redundanz der microRNA-Gene begründet. Für *miR164*, zu deren Genfamilie drei Loci gehören, konnte beispielsweise eine funktionelle Redundanz bei der Regulation der Zieltranskripte aufgedeckt werden und verschiedene Expressionsdomänen der unterschiedlichen *miR164* Gene beschrieben werden (Sieber *et al.*, 2007). Eine Redundanz wurde auch für die miRNA Gene der *miR166*-Familie gefunden (Williams *et al.*, 2005).

In vorläufigen RNA-ISH-Experimenten wurde eine *miR171* „Locked Nucleotide Acid“ (LNA) Sonde (LNATM, Exiqon, Dänemark) verwendet, die gegen die „Seed-Sequenz“ von *miR171* gerichtet war. Das gefundene Expressionsmuster war vergleichbar mit den Expressionsdomänen von *SCL22* und *SCL27* (Daten nicht gezeigt). Zur Familie der *miR171* Gene gehören neben *miR171a* auch *miR171b* und *miR171c*. Es ist deshalb möglich, dass die drei Loci *miR171a*, *miR171b* und *miR171c* durch Subfunktionalisierung verschiedene Funktionen und Expressionsdomänen angenommen haben. Möglicherweise wird das *miR171*-Expressionsmuster von Tabak in *A. thaliana* durch die drei *miR171* Gene gemeinsam repräsentiert. Diese Vermutung soll in Expressionsstudien überprüft werden. In zukünftigen RNA-ISH-Experimenten wird eine Sonde, die die *miR171* „Seed-Sequenz“ und flankierende Basen erkennt, eingesetzt, um spezifisch die Vorläufer-miRNA der *miR171a* zu detektieren. Eine mögliche Expression von *miR171a* im Meristem soll anhand dieses Experiments analysiert und die Expressionsdomäne mit den Expressionsmustern von *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* verglichen werden.

4.2.5 In den Achseln der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten werden Meristeme angelegt

Die Analysen der Mutanten *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1* zeigten, dass in den meisten untersuchten Blattachsen eine Seitentriebknospe fehlte. Eine Annahme war, dass in diesen Achseln die Bildung von Lateralmeristemen gestört war. In RNA-ISH-Experimenten wurde deshalb die Identität von Zellen der Blattachsen überprüft.

In einem Experiment mit Apices von *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Pflanzen konnte anhand des Meristemmarkers *STM* ein meristematischer Charakter für Zellen der axilären Region nachgewiesen werden (Kap. 3.7.4). Obwohl die überwiegende Anzahl an Blattachsen keine Knospe bildete, war ein Lateralmeristem etabliert worden. Die *STM*-Expression in den Achseln der Mutanten lässt vermuten, dass in diesen Pflanzen ein späterer Schritt der Entwicklung zum sekundären Trieb gestört ist. Im Unterschied zu den *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten fand sich in der interprimordialen Region der *las-4*-Mutante keine meristematische Identität (Greb, 2003). Die Daten deuten darauf hin, dass die *SCL*-Genaktivitäten für die Initiation der Lateralmeristeme nicht notwendig sind.

In einigen Rosettenblattachsen der Mutanten *scl27-1*, *scl6-1 scl27-1*, *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1* entwickelten sich nur Blätter anstelle eines Seitentriebs. Der korrespondierende Seitentrieb war in der Achsel nicht erkennbar. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass für diese Seitentriebe die Aktivität des Achselmeristems nicht erhalten blieb. Die *SCL*-Gene werden deswegen vermutlich zu einem Zeitpunkt der Entwicklung des Seitentriebs benötigt, nachdem die ersten Primordien des sekundären Triebes angelegt wurden.

Interessanterweise konnte in einem vergleichbaren RNA-ISH-Experiment mit einer *STM*-Sonde ebenfalls eine meristematische Identität in Achseln des Ökotyps Zu-0 nachgewiesen werden (Kalinina *et al.*, 2002). Diese Daten deuten darauf hin, dass, ähnlich wie in den *scl27-1*, *scl6-1 scl27-1*, *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten, ein Lateralmeristem in den Blattachsen des Zu-0 Ökotyps angelegt wurde, die weitere Entwicklung des Meristems zur Seitentriebknospe aber nicht stattfand. Allerdings zeigten die leeren Blattachsen der Zu-0-Pflanzen entweder keine Anzeichen einer meristematischen Struktur oder nur eine leichte Vorwölbung. Hinweise auf einen frühzeitig terminierten Seitentrieb liegen nicht vor. Die Daten deuten darauf hin, dass die Entwicklung der Lateralmeristeme zum Seitentrieb in den Zu-0-Pflanzen möglicherweise zu einem früheren Zeitpunkt beeinträchtigt wird, als in den *scl*-Mutanten.

In einem weiteren RNA-ISH-Experiment mit Apices der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten konnte die Expression von *LAS* in der interprimordialen Region nachgewiesen werden (Kap. 3.7.4). Dies deutet darauf hin, dass *LAS* in einem früheren Schritt der Lateralmeristembildung benötigt wird und nicht durch eines der drei *SCL*-Gene reguliert wird. Die Untersuchungen der Doppelmutanten von *las-4* und *scl6-1*, *scl22-1* oder *scl27-1* zeigten außerdem, dass die Allele *scl6-1* und *scl22-1* den *las-4*-Verzweigungsdefekt während der reproduktiven Phase nicht verstärkten. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlenden *SCL6*- oder *SCL22*-Genaktivitäten durch redundante Gene kompensiert wurden. Die Doppelmutante zwischen *las-4* und *scl27-1* zeigte additive und verstärkende Merkmale. Die Anlage sekundärer und tertiärer Triebe während der reproduktiven Phase war stärker reduziert, als für die *scl27-1* (Kap. 3.3.3) und *las-4* (Clarenz, 2004)-Einzelmutanten beschrieben. Der Phänotyp der Doppelmutante deutet darauf hin, dass *SCL27* und *LAS* möglicherweise Funktionen in zwei voneinander unabhängigen Signalwegen haben. Es konnte gezeigt werden, dass *scl27-1* ein Verstärker des *las-4*-Phänotyps ist, der wie die *eol*-Phänotypen (Clarenz, 2004) von der Länge der Photoperiode abhängt.

4.2.6 Morphologische Veränderungen des Apikalmeristems in den *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten

Eine mögliche Ursache der Termination des Wachstums der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten unter Kurztagbedingungen könnte die veränderte Morphologie des Apikalmeristems sein. In Experimenten zum Einfluss der Photoperiode auf den Erhalt des Meristems konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Kultivierung unter Kurztagbedingungen eine definierte Periode nicht überschreiten durfte. Die kritische Länge betrug etwa vier bis fünf Wochen Anzucht in kurzen Photoperioden. Nach dieser Periode konnte die Termination der Pflanzen durch Anzucht in langen Photoperioden nicht mehr verhindert werden.

Die histologischen Untersuchungen zu Veränderungen des Meristems wurden an Apices der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutante durchgeführt (Kap. 3.8). Anhand Toluidin-Blau gefärbter Gewebelängsschnitte durch Sprossspitzen von Pflanzen, die für einen Zeitraum von 21 bis 49 Tagen unter Kurztagbedingungen wuchsen, wurden diese Veränderungen verfolgt. Die Untersuchungen zeigten, dass Meristeme der Mutante Änderungen in der strukturellen Organisation erfahren hatten. Diese Änderungen beinhalteten eine Zunahme der Zellzahl und der Zellschichten im Apikalmeristem und eine Vergrößerung der apikalen Region. Eine Steigerung der Anzahl an Zellschichten

konnte mit einer verlängerten Anzucht der Pflanzen in kurzen Photoperioden korreliert werden. Zusätzlich änderte sich die domförmige Erscheinung des Meristems. Bereits nach 21 Tagen zeigte die Meristemspitze eine abgeflachte Form.

Im Gegensatz zu den Analysen von Stuurman *et al.* (2002) konnte in der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante keine Differenzierung der Zellen im Apex beobachtet werden und auch die Zellteilungsaktivität schien nicht reduziert zu sein. Ein möglicher Grund für die gesteigerte Zellzahl in den Meristemen könnte die limitierte Bildungsrate von lateralen Organen sein. Die *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutanten terminierten ihr Wachstum nach der Bildung einer definierten Anzahl von Blättern. Es ist denkbar, dass der Verlust der Genaktivitäten von *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* einen negativen Einfluss auf die Organbildung hat. Die Entwicklung der Zellen im Meristem kann in zwei Phasen eingeteilt werden: eine meristematische Wachstumsphase, in der Zellteilungen stattfinden, und eine Phase, in der die Zellgröße zunimmt (Chen *et al.*, 2002). Laufs *et al.* (1998) fanden heraus, dass die Zellteilung im Meristem an die Bildung von Blättern gekoppelt ist. Arbeiten von Wyrzykowska *et al.* (2002) zeigten allerdings, dass allein durch die Induktion der Zellteilungsaktivität und eine Erhöhung der Zellzahl eine Organbildung im Meristem nicht ausgelöst werden kann. Eine Stimulierung des Zellwachstums durch exogene Gabe von Expansin führte zu einer Organbildung (Pien *et al.*, 2001). Weitere Hinweise, dass die Organbildung nicht allein durch Zellteilungen determiniert ist, geben die Arbeiten von Wyrzykowska *et al.* (2006), in denen eine Funktion des Retinoblastoma-ähnlichen Proteins (RBR) beim Übergang der Meristemzellen von der Zellteilungsphase zur Phase des differenzierten Wachstums gefunden wurde.

Möglicherweise aktivieren die Genprodukte von *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* einen Faktor, der positiv auf die Organbildung wirkt. Unter Kurztagbedingungen tritt die Termination des Wachstums der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten erst relativ spät, nach der Bildung von etwa 20 Blättern, auf. Die Wirkung von *SCL22* und *SCL27* auf die Initiation oder das Wachstum von Primordien wird also nicht von Anfang an benötigt. Wahrscheinlich wirken redundante Signalwege zu Beginn des Wachstums unter Kurztagbedingungen auf das Wachstum von Blattprimordien. In ähnlicher Weise regulieren vermutlich redundante Signalwege in langen Photoperioden die Bildung der Primordien in der *scl22-1 scl27-1*-Doppelmutante und der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante. In weiterführenden Experimenten soll die Expression von Genen, die spezifisch in Blattprimordien exprimiert sind, in terminierten Meristemen der Tripelmutante untersucht werden. Ein solches Gen ist beispielsweise der MYB-Transkriptionsfaktor *AS1*, der durch Unterdrückung der *STM*-Expression in den Primordien die Differenzierung der Zellen fördert (Byrne *et al.*, 2000). Informationen

zum Expressionsmuster dieser Gene können helfen, detaillierter zu verstehen, wie SCL6, SCL22 und SCL27 im Meristem die Zellteilung und Organbildung beeinflussen.

Eine weitere Möglichkeit für den Terminationsphänotyp der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten ist, dass in den vergrößerten Meristemen der Austausch und Transport von Signalmolekülen nicht gewährleistet werden kann. Die Zellen im Meristem sind über Plasmodesmata miteinander verbunden und stellen ein symplastisches Kontinuum dar. Zellen der peripheren und der zentralen Zone sind allerdings voneinander isoliert (Rinne und van der Schoot, 1998; Gisel *et al.*, 1999). Möglicherweise können wichtige Signale zur Organbildung in den veränderten Meristemen der Mutanten nicht an ihren Wirkungsort gelangen. Eine nicht funktionale Tunica-Schicht in den Meristemen der *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten führt möglicherweise dazu, dass der Auxin-Fluss im Meristem verändert ist und dadurch die Initiation der Primordien gestört wird. Auxin wird überwiegend in den äußeren Zellschichten des Meristems transportiert. Der Auxin-Ausstrom in der L1-Schicht wird durch PIN-Proteine, die in der antiklinalen Membran der Zellen lokalisiert sind, unterstützt. Eine Entfernung der L1-Schicht führt zu einem Verlust der Blattanlage (Reinhardt *et al.*, 2003).

4.2.7 In Meristemen terminierter Apices ist die meristematische Identität erhalten und die Differenzierung der Primordien unterdrückt

Ein Hinweis, dass die Termination der Apikalmeristeme der Mutanten *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1* einen anderen Grund hat, als die durch Mutationen im *STM*- oder *WUS*-Locus verursachten Terminierungen, konnte in RNA-ISH-Experimenten mit Apices der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante bestätigt werden (3.8.3). Stuurman *et al.* (2002) stellten zwei Wochen nach der Termination des Wachstums eine Verminderung der *STM*- und *WUS*-Expression in *ham*-Apices fest. Zum Zeitpunkt der Termination waren die Expressionsstärken von *STM* und *WUS* noch unverändert. Diese Daten zeigten, dass in den Apices der *ham*-Mutante die Expression von *STM* und *WUS* nicht ausreichend war, um den meristematischen Charakter aufrechtzuerhalten und eine Differenzierung der Zellen zu verhindern (Stuurman *et al.*, 2002). Gallois *et al.* (2002) zeigten, dass durch eine ektopische Expression von *STM* zwar ein meristematisches Potenzial verliehen werden kann, dass eine vollständige meristematische Funktion und eine Organbildung aber von weiteren Faktoren abhängt.

Die Analysen der Expressionsstärken von *WUS* und *STM* in Apices der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante zeigten, dass eine Abnahme der Expressionen dieser beiden

Gene nicht festgestellt werden konnte (Kap. 3.8.3). Die Expressionsstärken von *WUS* und *STM* waren auch nach 41 Tagen Kultivierung unter Kurztagbedingungen unverändert. Dies deutete darauf hin, dass, anders als in der *ham*-Mutante, nach der Termination keine Differenzierung der Zellen im Apikalmeristem der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante stattgefunden hatte und der meristematische Charakter erhalten blieb.

Die Apikalmeristeme der Mutanten *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1* wiesen nach längerer Kultivierungsdauer unter Kurztagbedingungen eine veränderte Struktur auf. Die Zellzahl nahm zu und die Schichten meristematischer Zellen waren erhöht. In Analysen zur *STM*-Expression in Apices der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante, die für unterschiedlich lange Zeiträume in kurzen Photoperioden angezogen wurden, konnte eine Veränderung der *STM*-Expressionsdomäne beobachtet werden (Kap. 3.8.3.1). Diese war größer als in Wt-Apices und umfasste die zusätzlichen Zellschichten im Meristem. Das charakteristische Expressionsmuster von *STM* im Meristem (Long und Barton, 1998), in dem die Expression von *STM* in den Primordien repräsentiert wird, konnte in diesen Apices bestätigt werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Initiation der Primordien-bildung in den *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten nicht verändert ist. Vielmehr scheint ein essenzieller Schritt nach der Initiation zu fehlen, der die Entwicklung der Primordien zu Blättern steuert.

Die Analysen der *WUS*-Expression in Apices der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante zeigten, dass die Expression in terminierten Apices vorhanden war. Allerdings konnte eine Verschiebung der *WUS*-Expressionsdomäne in tiefere Zellschichten beobachtet werden (Kap. 3.8.3.2). Im Meristem von Wt-Pflanzen ist die Expression von *WUS* in Zellen der zentralen Zone in der L3-Schicht zu finden (Laux *et al.*, 1996). Eine Schichtung nach dem Tunica-Corpus-Konzept (Vaughan, 1952; Steeves und Sussex, 1989) konnte in Apices der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante nach einer längeren Periode der Anzucht in kurzen Photoperioden nicht mehr beobachtet werden. Eine Zuordnung der Expressionsdomäne von *WUS* zu einer „funktionellen“ Schicht ist dadurch nicht möglich. Möglicherweise stellen die über der *WUS*-Domäne liegenden Schichten zusätzliche Tunica-Schichten dar, ein Phänomen, welches für Apices spätblühender Pflanzen beschrieben wurde (Grbic und Bleecker, 1996). Dies könnte bedeuten, dass in den Apices der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante eine Vervielfältigung der Tunica-Zellen stattgefunden hat und die Domäne der *WUS*-Expression deswegen scheinbar in tieferen Schichten liegt. Die Expressionsdomäne des Peptids CLV3 markiert Zellen der sogenannten Stammzellzone in der L1- und L2-Schicht des Meristems. Zukünftige RNA-ISH-Experimente, in denen das

Expressionsmuster von *CLV3* analysiert wird, sollen Auskunft über den Charakter der Zellen oberhalb der *WUS*-Expressionsdomäne geben.

Im Wt-Meristem grenzt die *WUS*-Domäne an Zellen des Rippenmeristems, die, im Gegensatz zu Zellen des Corpus, ausdifferenzierter sind und eine größere Vakuole besitzen. Im Apex der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Tripelmutante fanden sich unterhalb der *WUS*-Expressionsdomäne allerdings statt ausdifferenzierter Zellen kleinere Zellen, die durch ein positives *STM*-Signal als meristematische Zellen identifiziert werden konnten. Möglicherweise wird die Identität dieser Zellen in Wildtyp-Apices durch die Aktivitäten der *SCL22* und *SCL27*-Genprodukte, deren Expressionsdomäne an Zellen des Rippenmeristems grenzt, beeinflusst.

Die Analyse der *HAM*-ähnlichen Gene in *A. thaliana* zeigte, dass diese zumindest teilweise eine andere Funktion im Meristem ausüben, als *HAM* in Petunie. In *ham*-Mutanten differenziert das Meristem und entwickelt sich als Weiterführung des Haupttriebs. Für die Funktion des *HAM*-Proteins wurden zwei Modelle vorgeschlagen. In dem ersten wird angenommen, dass *HAM* ein Antidifferenzierungssignal aussendet oder als Verbindung zu einem solchen notwendig ist. Eine weitere Möglichkeit wäre die Inhibierung eines Differenzierungssignals durch *HAM* (Angenent *et al.*, 2005).

Die histologischen Untersuchungen der Meristeme und der Nachweis der meristematischen Identität durch die positiven Signale der Meristemmarker *WUS* und *STM* in Meristemen terminierter Apices deuten darauf hin, dass die Termination der Meristeme in den *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten nicht auf Differenzierungsprozessen der meristematischen Zellen beruht. Die Termination der Meristeme nach einer definierten Anzahl gebildeter Blätter deutet vielmehr darauf hin, dass ein wesentlicher Faktor in der Entwicklung der Primordien fehlt, der eine weitere Differenzierung der primordialen Zellen zu Blättern steuert.

4.2.8 Die Aktivität von SCL22 und SCL27 beeinflusst den Erhalt der Grenzen von Apikal- und Lateralmeristem

In den histologischen Untersuchungen zu Veränderungen in den Meristemen der Mutanten *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1* wurden Zentren kleiner Zellen im Sprossgewebe unterhalb des Apikalmeristems entdeckt, die in Meristemen parallel angezogener Wildtyppflanzen nicht vorkamen (Kap. 3.8). Da für diese Zentren in RNA-ISH-Experimenten mit einer *STM*- und einer *WUS*-Sonde eine meristematische Identität nachgewiesen werden konnte, wurden sie als „ektopische Meristeme“ im Spross

bezeichnet (Kap. 3.8.3.1 und Kap. 3.8.3.2). Sie konnten bereits in 28 Tage alten Apices der *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Tripelmutante nachgewiesen werden. Die Entstehung dieser ektopischen Meristeme war zeitlich gebunden an die in Längsschnitten sichtbaren Veränderungen im Apikalmeristem der *sc122-1 sc127-1* und *sc16-1 sc122-1 sc127-1*-Mutanten. Möglicherweise waren diese Zentren aus den zusätzlichen Zellen, die sich unterhalb der *WUS*-Expressionsdomäne befanden, entstanden. Es ist denkbar, dass einige Zellen durch Differenzierungsprozesse von darüber liegenden Zellen des Meristems getrennt wurden, ihre meristematische Identität behielten und Meristemzentren im Sprossgewebe bildeten, die durch Wachstumsprozesse der umgebenden Zellen vom eigentlichen Meristem separiert wurden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass diese Meristeme aus Lateralmeristemen hervorgingen. Zellen mit meristematischem Charakter könnten durch einen ähnlichen Mechanismus in das Gewebe des Sprosses gelangt sein.

In Blattachsen der Mutanten *sc122-1 sc127-1* und *sc16-1 sc122-1 sc127-1* wurden Aufwölbungen gefunden, die Meristemdome (MD) genannt wurden (Kap. 3.4.3 und Kap. 3.4.4). Die Entstehung dieser MD war unabhängig von der Photoperiode, da sie sich unter Kurz- und Langtagbedingungen bildeten. Eine Annahme war, dass die MD stark proliferierte Lateralmeristeme darstellten. Eine detaillierte Untersuchung der MD zeigte aber, dass die Zellen der Oberfläche in ihrer Anordnung und Größe nicht denen eines Apikalmeristems glichen. Mittels eines Gefrierbruchs und REM konnte auch die Struktur im Inneren der MD analysiert werden (Kap. 3.9). Neben differenzierten größeren Zellen fanden sich auch kleinere Zellen, die kreisförmig gruppiert waren. Diese Organisation im Inneren der MD konnte in einem Toluidin-Blau gefärbten Gewebeschnitt durch ein MD bestätigt werden. Dort fanden sich kleine Zellen in einer kreisförmigen Anordnung und waren von größeren differenzierten Zellen umgeben. Für diese Zentren kleiner Zellen im MD konnte durch RNA-ISH-Experimenten mit einer *STM*-Sonde ebenfalls eine meristematische Identität nachgewiesen werden. Für dieses Experiment wurden Rosettenblattachsen einer im Langtag gewachsenen Pflanze verwendet. Auch in diesem Bereich des Sprosses traten ektopische Meristeme auf. Es ist möglich, dass diese Zentren im Sprossgewebe aus meristematischen Zellen des Apikalmeristems entstanden waren. Wahrscheinlicher ist aber, dass sie aus dem Lateralmeristem hervorgingen. In vielen Blattachsen konnten mittels RNA-ISH-Experimenten mehrere Meristemzentren nachgewiesen werden. In einigen Apices befand sich außerdem ein Lateralmeristem in größerer Nähe zum Sprossgewebe als zur eigentlichen Blattachsel. Eine ähnliche Verschiebung der Lateralmeristeme wurde in Untersuchungen zur *WUS*-Expression auch für die *ham*-Mutante gezeigt (Stuurman *et al.*, 2002).

Ähnlich wie im Apikalmeristem führt der Verlust der *SCL22* und *SCL27*-Genaktivitäten im Lateralmeristem zu einer erhöhten Zellteilung und einer Unterdrückung der Organbildung. Der Mechanismus der Entstehung der ektopischen Meristeme im Spross und in den MD der Blattachsen beruht möglicherweise auf der gleichen Ursache. Durch die fehlende Genaktivität von *SCL22* und *SCL27* wird das Apikal- oder Lateralmeristem möglicherweise nicht zum Sprossgewebe abgegrenzt und meristematische Zellen gelangen durch Wachstumsprozesse der Pflanze in das Sprossgewebe.

In weiterführenden Analysen zur Funktion der *SCL*-Gene auf die Entwicklung von Lateralmeristemen sollen „expression profiling“-Experimente mit RNA von Geweben der MD durchgeführt werden, um Kandidaten, die durch *SCL22* und *SCL27* reguliert werden, zu identifizieren. Ein möglicher Kandidat ist der TCP-Transkriptionsfaktor *BRC1* (Aigular-Martínez *et al.*, 2007). *BRC1* wird in sich entwickelnden Lateralmeristemen exprimiert. Eine Verlustmutante, *brc1*, ist durch ein verstärktes Wachstum der Seitentriebe gekennzeichnet. *BRC1* verzögert die vegetative Entwicklung der Seitentriebknospe. Die Expression von *BRC1* ist ab dem Zeitpunkt, zu dem die Primordien des Seitentriebs angelegt werden, herunterreguliert. In einer genetischen Analyse könnte die Beziehung der *SCL*-Gene zu *BRC1* untersucht werden. Möglicherweise supprimieren *SCL22* und *SCL27* die Aktivität von *BRC1*.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung von Regulatoren der Seitentriebentwicklung von *A. thaliana*. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das mutierte Gen der Mutante *eo15*, in der der *las-4*-Phänotyp verstärkt wurde, kartiert. Die Analysen mit SSLP- und CAPS-Markern zeigten, dass *eo15* auf Chromosom 2 lokalisiert ist und dass auf Chromosom 5 des *Ler*-Ökotyps ein QTL lokalisiert ist, den den Verzweigungsdefekt der *las-4*-Mutante verstärkt. Der Einfluss dieses QTL und der Anteil von *Ler*-Allelen auf den *las-4*-Phänotyp wurde durch Rückkreuzungen vermindert. Die F2-Generationen dieser Rückkreuzungen werden als Grundlage zur Feinkartierung von *eo15* auf Chromosom 2 genutzt. Entsprechende molekulare Marker wurden etabliert.

Die Grundlage für den zweiten Teil dieser Arbeit lieferte der Verzweigungsdefekt von *35S::miR171* Pflanzen. Die Fehlexpression der *miR171a* in *A. thaliana* führte bei Pflanzen unter Langtagbedingungen zu einer stark verminderten Bildung von Seitentrieben während der vegetativen und reproduktiven Phasen der Entwicklung. Bei der Kultivierung in kurzen Photoperioden terminierten die Pflanzen ihr Wachstum während der vegetativen Phase. *In silico* Analysen zeigten, dass die drei GRAS-Gene *SCL6*, *SCL22* und *SCL27* die Zielgene von *miR171* sind.

Es wurden Verlustmutanten der drei Gene isoliert und der Ausfall der *SCL6*-, *SCL22*- oder *SCL27*-Genaktivitäten auf das Verzweigungsmuster von *A. thaliana* untersucht. Die Einzelmutante *scl27-1* zeigte eine veränderte Seitentriebbildung unter Kurztagbedingungen, die in der vegetativen und reproduktiven Phase der Entwicklung auftrat. Die Erzeugung aller möglichen Doppelmutanten und einer Tripelmutante für die mutierten Allele *scl6-1*, *scl22-1* und *scl27-1* diente dazu, durch funktionelle Redundanz verdeckte Funktionen der Proteine zu identifizieren. Es wurde gefunden, dass auch *SCL6* und *SCL22* die Seitentriebentwicklung beeinflussen. Die *scl22-1 scl27-1*-Doppelmutante zeigte eine Phänokopie der *35S::miR171*-Linie.

Weitere Experimente zum Einfluss der Photoperiode auf den Terminationsphänotyp der *scl22-1 scl27-1* und der *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutante zeigten, dass die Dauer der Kultivierung unter Kurztagbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Termination des Apikalmeristems hat. *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten, die nach mehr als 35 Tagen Wachstum unter Kurztagbedingungen durch lange Photoperioden induziert wurden, hatten die Kompetenz verloren, die Termination des Apikalmeristems zu verhindern. Dieser Einfluss zeigte sich auch in *35S::miR171*

co-Pflanzen. Ohne *CO*-Genaktivität bildete sich auch unter Langtagbedingungen ein Terminationsphänotyp aus.

Die Funktionen der drei *SCL* Gene wurden auch in RNA-ISH-Experimenten untersucht. Es zeigte sich, dass *SCL22* und *SCL27* ein sehr ähnliches Expressionsmuster aufwiesen. Transkripte beider Gene fanden sich im vegetativen und reproduktiven Apikalmeristem, in Lateralmeristemen und in den Leitbündeln von Spross und Blatt. *SCL6* Transkripte wurden in der interprimordialen Region im vegetativen und reproduktiven Apikalmeristem nachgewiesen.

Die Funktion von *SCL22* und *SCL27* bei der Seitentriebentwicklung wird nach der Initiation der Lateralmeristeme benötigt. Neben den phänotypischen Daten der Mutanten *scl27-1*, *scl6-1 scl27-1*, *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1* bestätigten dies auch RNA-ISH-Experimente mit den Meristemmarkern *STM* und *LAS*. In Apices der Mutanten *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1* konnte eine meristematische Identität der Achselzellen nachgewiesen werden. Die Aktivitäten von *SCL22* und *SCL27* sind vermutlich bei der Entwicklung von Lateralmeristemen zu Seitentriebknospen notwendig.

Durch die Charakterisierung der Doppelmutanten von *las-4* und *scl6-1*, *scl22-1* oder *scl27-1* sollte eine mögliche Funktion der Proteine in einem regulatorischen Signalweg aufgedeckt werden. Die Analyse der *las-4 scl27-1*-Mutante zeigte, dass sich die Phänotypen der Einzelmutanten addierten und dass das *scl27-1* Allel den *las-4*-Phänotyp verstärkte.

Die histologischen Analysen von *scl22-1 scl27-1*, *scl6-1 scl22-1 scl27-1* und Wildtyp-Pflanzen ergaben, dass sich im Meristem der Mutanten zusätzliche Zellschichten bildeten. Diese Zunahme korrelierte mit der Dauer der Kultivierung der Pflanzen im Kurztag. Eine weitere auffällige Veränderung in den Mutanten war das Auftreten von ektopischen Meristemen, die isoliert im Sprossgewebe lagen. Ihr meristematischer Charakter konnte in RNA-ISH-Experimenten mit den Meristemmarkern *STM* und *WUS* nachgewiesen werden. Auch in den Strukturen, die sich als Vorwölbungen in den Blattachseln von *scl22-1 scl27-1* und *scl6-1 scl22-1 scl27-1*-Mutanten bildeten und Meristemdome genannt wurden, fanden sich ähnliche ektopische Meristeme.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die drei *SCL*-Proteine eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und der Organbildung im Apikal- und Lateralmeristem spielen.

6. Abstract

Aim of this thesis was the identification and characterisation of novel regulators of side shoot formation in *A. thaliana*. The focus of the first part was mapping of the mutated gene of the *eo15* mutant. This mutant is characterised by an enhancement of the *las-4* phenotype. Analysis with SSLP and CAPS markers revealed a localisation of *eo15* on chromosome 2 and a QTL from the ecotype *Ler* on chromosome 5, which enhances the *las-4* phenotype. Backcrosses were performed to diminish the influence of the QTL and *Ler* alleles on the *las-4* phenotype. The F2 generations of these backcrosses will be used for fine mapping of *eo15* on chromosome 2. New molecular markers for this approach have been established.

The branching defect of *35S::miR171* plants was the starting point of the second part of the thesis. Under long day conditions, misexpression of *miR171a* in *A. thaliana* resulted in an enhanced reduction of side shoot formation during the vegetative and reproductive phase of development. The plants terminated growth in short photoperiods during the vegetative phase. *In silico* analysis revealed that three GRAS genes, *SCL6*, *SCL22* and *SCL27*, are target genes of *miR171*.

To evaluate the influence of *SCL6*, *SCL22* and *SCL27* on the branching pattern in *A. thaliana* loss of function mutants for all three genes were isolated and phenotypically characterised. In short photoperiods, the mutant *scl27-1* showed altered formation of side shoots during the vegetative and reproductive phase of development. All possible double mutants and a triple mutant were generated to uncover possible functional redundancies among the three proteins. Analysis of these mutants revealed that *SCL6* and *SCL22* also have an impact on side shoot formation. The double mutant *scl22-1 scl27-1* phenocopies the *35S::miR171* line.

Further investigations indicated an influence of the photoperiod on the termination phenotype in *scl22-1 scl27-1* and *scl6-1 scl22-1 scl27-1* mutant plants and that extended cultivation in short photoperiods is essential for termination of the apical meristem. *scl22-1 scl27-1* and *scl6-1 scl22-1 scl27-1* plants, grown for more than 35 days under short day conditions and thereafter induced by long photoperiods, lost their ability to prevent termination of the apical meristem. This photoperiodic influence on the termination phenotype was also observed in *35S::miR171 co* plants. Without *CO* activity, the plants developed a termination phenotype under long day conditions.

A function of the three *SCL* genes was also analysed by RNA-ISH experiments. The expression pattern of *SCL22* and *SCL27* were similar and transcripts of both genes

were detected in apical meristems of vegetative and reproductive stage, lateral meristems and the vasculature of shoots and leaves. *SCL6* transcripts were detected in interprimordial regions of vegetative and reproductive apical meristems.

The activity of *SCL22* and *SCL27* is needed for the development of side shoots after the initiation of lateral meristems. This was indicated by the phenotypic data of *scl27-1*, *scl6-1 scl27-1*, *scl22-1 scl27-1* and *scl6-1 scl22-1 scl27-1* mutant plants and could be confirmed in RNA-ISH experiments with the meristem markers *STM* und *LAS*. A meristematic identity of cells in the interprimordial region of apices of *scl22-1 scl27-1* and *scl6-1 scl22-1 scl27-1* mutant plant was detected. A possible function of the three proteins and *LAS* in one regulatory pathway was investigated by the characterisation of double mutants between *las-4* and *scl6-1*, *scl22-1* or *scl27-1*. Analysis of *las-4 scl27-1* mutant plants revealed an additive phenotype. Furthermore, the *scl27-1* allele enhanced the *las-4* phenotype.

Histological analysis of *scl22-1 scl27-1*, *scl6-1 scl22-1 scl27-1* and wildtype plants was performed to detect morphological differences. It was shown that mutant plants developed extra layers of cells within the meristem. This increase in cell layers correlated with the cultivation period under short day conditions. The occurrence of insulated ectopic meristems within the shoot tissue was another morphological difference between mutant and wildtype plants. The meristematic character of these ectopic meristems was proven in RNA-ISH experiments with *STM* und *WUS* as meristem markers. Similar ectopic meristems were found in structures called "Meristemdom", which developed as protrusions within the leaf axils of *scl22-1 scl27-1* and *scl6-1 scl22-1 scl27-1* mutant plants.

The results of this thesis suggest an important role for the three SCL proteins in the process of cell division and organ formation in shoot- and lateral meristem.

7. Literaturverzeichnis

Aguilar-Martínez JA, Poza-Carrio C, Cubas P (2007) *Arabidopsis* BRANCHED1 Acts an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds. *Plant Cell* **19**: 458-472.

Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H and Tasaka M (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**: 841–857.

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657.

Angenent GC, Stuurman J, Kimberley CS and Koes R (2005) Use of *Petunia* to unravel plant meristem functioning. *Trends in Plant Science* **10** (5): 243-250.

Barton MK and Poethig RS (1993). Formation of the Shoot Apical Meristem in *Arabidopsis-thaliana* - an Analysis of Development in the Wild-Type and in the *Shoot Meristemless* Mutant. *Dev* **119**: 823-831.

Baumann E, Lewald J, Saedler H, Schulz B, Wisman E (1998) Successful PCR-based reverse genetic screens using an *En-1*-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent. *Theoret Appl Genet* **97**: 729-734.

Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschnig C and Leyser O (2006) The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol* **16**: 553–563.

Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC (1996) Branching in *Pisum*: action of genes *Rms3* and *Rms4*. *Plant Physiol* **110**: 859-865.

Bharathan G., Janssen BJ, Kellogg EA and Sinha N (1999) Phylogenetic relationships and evolution of the KNOTTED class of plant homeodomain proteins. *Mol Biol Evol* **16**: 553–563.

Bolle C (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**: 683-692.

Bouchez D, Camilleri C, Caboche M (1993). A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *C R Acad Sci III Sci Vie* **316**: 1188-1193.

Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM and Simon R (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**: 617-619.

Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA (2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408** (6815): 967-971.

- Byrne ME, Simorowski J and Martienssen RA** (2002) *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *KNOX* gene redundancy in *Arabidopsis*. *Dev* **129**: 1957-1965.
- Carles CC, Lertpiriyapong K, Reville K and Fletcher JC** (2004) The *ULTRAPETALA1* gene functions early in *Arabidopsis* development to restrict shoot apical meristem activity and acts through *WUSCHEL* to regulate floral meristem determinacy. *Genetics* **167**: 1893–1903.
- Chen JG, Ullah H, Young JC, Sussman MR, Jones AM** (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes & Dev* **15**: 902-911.
- Chuck G, Lincoln C, Hake S** (1996) *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1277-1289.
- Clarenz O** (2004) Studien zu Rolle des *LATERAL SUPPRESSOR*-Gens bei der Initiation von Achselmeristemen: Analyse von Doppelmutanten und Charakterisierung von Modifikatoren des *las-4*-Phänotyps. *Dissertation, Universität zu Köln*.
- Clark SE, Running MP and Meyerowitz EM** (1993). *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Dev* **119**: 397-418.
- Clark SE, Williams RW and Meyerowitz EM** (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**: 575-585.
- Coen ES, Romero JM, Doyle S, Elliott R, Murphy G, Carpenter R** (1990) *floricaula*: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* **63**: 1311-1322.
- Dean G, Casson S and Lindsey K** (2004) *KNAT6* gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation. *Plant Mol Biol* **54**: 71–84.
- Dengler NC** (2006) The shoot apical meristem and development of vascular architecture. *Can J Bot* **84**: 1660-1671.
- Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Fiedmann KA, Benfey PN** (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86** (3): 423-433.
- Doebley J, Stec A, Hubbard L** (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386** (6230): 485-488.
- Douglas SJ, Chuck G, Dengler RE, Pelecanda L and Riggs CD** (2002) *KNAT1* and *ERECTA* regulate inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 547–558.
- Duarte JM, Cui L, Wall PK, Zhang Q, Zhang X, Lebbens-Mack J, Ma H, Altman N, dePamphilis CW** (2006) Expression Pattern Shifts Following Duplication Indicative of Subfunctionalization and Neofunctionalization in Regulators Genes of *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol* **23** (2): 469-478.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.* **19** (6): 1349

- Fleet CM and Sun TP** (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Op Plant Biology* **8**: 77-85.
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R and Meyerowitz EM** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**: 1911-1914.
- Gallavotti A, Zhao Q, Kyojuka J, Meeley RB, Ritter M, Doebley JF, Pe ME, Schmidt RJ** (2004) The role of *barren stark1* in the architecture of maize. *Nature* **432**: 630-635.
- Gallois JL, Woodward C, Reddy GV and Sablowski R** (2002) Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Dev* **129**: 3207–3217.
- Gisel A, Barella S, Hempel FD and Zambryski PC** (1999) Temporal and spatial regulation of symplastic trafficking during development in *Arabidopsis thaliana* apices. *Dev* **126**: 1879–1889.
- Grbic V and Bleecker AB** (1996) An altered body plan is conferred on *Arabidopsis* plants carrying dominant alleles of two genes. *Dev* **122**: 2395-2403.
- Grbic V and Bleecker AB** (2000) Axillary meristem development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **21** (2): 215-223.
- Greb T** (2003) Untersuchungen zur Rolle des Gens *LATERAL SUPPRESSOR* in der Seitentriebentwicklung von *Arabidopsis thaliana* H. und der Tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). *Dissertation*, Universität zu Köln.
- Greb T, Clarenz O, Schäfer E, Müller D, Herrero R, Schmitz G, Theres K** (2003) Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev* **17**: 1175-1187.
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol Biol* **166**: 557 – 580
- Hardtke CS, Müller J, Berleth T** (1996) Genetic similarity among *Arabidopsis thaliana* ecotypes estimated by DNA sequence comparison. *Plant. Mol. Biol.* **33**: 915-922.
- Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M** (2002) The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol* **12**: 1557-1565.
- Heidstra R, Welch D, Scheres B** (2004) Mosaic analysis using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev* **18**: 1964-1969.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wsocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser M, Benfey PN** (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* **101** (5): 555-567.
- Hempel FD, Feldman LJ** (1994) Bi-directional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*: Acropetal initiation of flowers and basipetal initiation of paraclades. *Planta* **192** (2): 276-286.

Hibara K, Karim MR, Takada S, Taoka K, Furutani M, Aida M and Tasaka M (2006) *Arabidopsis* CUP-SHAPED COTYLEDON3 regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation. *Plant Cell* **18** (11): 2946-2957.

<http://asrp.cgrb.oregonstate.edu> (2007-02).

Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of *SLENDER RICE1* in Nuclei. *Plant Cell* **14**: 57-70.

Jones-Rhoades MW and Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* **14**: 787-799.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 19-53.

Kalinina A, Mihajlovic N and Grbic V (2002) Axillary meristem development in the branchless Zu-0 ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**: 699-707.

Kayes JM and Clark SE (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Dev* **125**: 3843-3851.

Kerstetter R, Vollbrecht E, Lowe B, Veit B, Yamaguchi J and Hake S (1994) Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1*-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell* **6**: 1877-1887.

Kerstetter RA, Laudencia-Chinguanco D, Smith LG and Hake S (1997) Loss-of-function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. *Dev* **124**: 3045-3054.

Kidner CA and Martienssen RA (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* **428**: 81-84.

Kirch T, Simon R, Grünwald M and Werr W (2003). The *DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* gene of *Arabidopsis* acts in the control of meristem cell fate and lateral organ development. *Plant Cell* **15**: 694-705.

Komatsu K, Maekawa M, Ujiie S, Satake Y, Furutani I, Okamoto H, Shimamoto K, Kyojuka J (2003) *LAX* and *SPA*: Major regulators of shoot branching in rice. *PNAS* **100** (20): 11765-11770.

Koumproglou R, Wilkes TM, Townson P, Wang XY, Beynon J, Pooni HS, Newbury HJ, Kearsy MJ (2002) STAIRS: a new genetic resource for functional genomic studies of *Arabidopsis*. *Plant J*: **31** (3): 355-64.

Laufs P, Grandjean O, Jonak C, Kieu K, Traas J (1998) Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1375-1390.

Laufs P, Peaucelle A, Morin H and Traas J (2004) MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Dev* **131**: 4311-4322.

- Laux T, Mayer KF, Berger J and Jurgens G** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Dev* **122**: 87-96.
- Lazar G and Goodman HM** (2006) *MAX1*, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *PNAS* **103**: 472–476.
- Lenhard M and Laux T** (2003) Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of *CLAVATA3* and its sequestration by *CLAVATA1*. *Dev* **130**: 3163-3173.
- Leyser HMO and Furner IJ** (1992). Characterisation of three shootapical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Dev* **116**, 397-403.
- Li X, Qian Q, Fu Z, Wang Y, Xiong G, Zeng D, Wang X, Liu X, Teng S, Hiroshi F, Yuang M, Luo D, Han B, Li J** (2003) Control of tillering in rice. *Nature* **422**: 618-621.
- Lincoln C, Britton J H, Estelle M** (1990) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 1071-1080.
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD and Carrington JC** (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* **297**: 2053–2056.
- Long JA, Moan EI, Medford JI und Barton MK** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-9.
- Long JA and Barton MK** (1998) The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Dev* **125**: 3027–3035.
- Long JA and Barton MK** (2000) Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 2000, **218**: 341-353.
- Lukowitz W, Gillmor C S, Scheible WR** (2000) Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels so good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiology* **123**: 795-805
- Lyndon RF** (1990) Plant Development. (*Topics in plant physiology; 3*) Unwin Hyman, London.
- Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton MK** (1999) The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* **126**: 469-481.
- Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP and Bartel B** (2004) MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol* **14**: 1035-1046.
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G and Laux T** (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**: 805-815.
- McConnell JR and Barton MK** (1998) Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Dev* **125**: 2935-2942.

- Morohashi K, Masayoshi M, Hisabumi T, Yasuo H, Kazuyuki H** (2003) Isolation and characterization of a novel GRAS gene that regulates meiosis-associated gene expression. *J Biol Chem* **278**: 20865-20873.
- Müller D** (2005) Studien zur Rolle von Blind-homologen *MYB*-Genen bei der Anlage von Achselmeristemen in *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation*, Universität zu Köln.
- Müller D, Schmitz G and Theres K** (2006) *Blind* homologous R2R3 *Myb* genes control the pattern of lateral meristem initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 586-597.
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN** (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413** (6853): 307-311.
- Napoli C** (1996) Highly branched phenotype of the *Petunia dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiology* **111** (1): 27-37.
- Napoli CA, Beveridge CA, and Snowden KC** (1999). Reevaluation concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Curr. Top. Dev. Biol.* **4**: 127–169.
- Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M and Laufs P** (2006) The balance between the coexpressed *MIR164A* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 2929-2945.
- Ori N, Eshed Y, Chuck G, Bowman JL and Hake S** (2000) Mechanisms that control knox gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Dev* **127**: 5523-5532.
- Otsuga D, DeGuzman B, Prigge MJ, Drews GN, Clark SE** (2001) *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J* **25**: 223-236.
- Page D and Grossniklaus U** (2002) THE ART AND DESIGN OF GENETIC SCREENS: *ARABIDOPSIS THALIANA*. *Nature Reviews Genetics* **3**: 124-136.
- Parizotto EA, Dunoyer P, Rahm N, Himber C, Voinnet O** (2004) *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev* **18**: 2237-2242.
- Peaucelle A, Morin H, Traas J and Laufs P** (2007) Plants expressing a *miR164*-resistant *CUC2* gene reveal the importance of post-meristematic maintenance of phyllotaxy in *Arabidopsis*. *Dev* **134**: 1045-1050.
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**(23): 3194-3205.
- Pien S, Wyrzykowska J, McQueen-Mason S, Smart C and Fleming AJ** (2001) Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *PNAS* **98**: 11812–11817.
- Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G** (1995) The *Constans* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**: 847-857.

Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN (1999) The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *Plant J* **18** (1): 111-119.

Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B and Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev* **16**: 1616-1626.

Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**: 255-260.

Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, Gershenzon J, Kowalczyk M, Sandberg G, Godde M, Uhl R, Palme K (2001) *bus*, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* **13** (2): 351-367.

Rinne P and van der Schoot C (1998) Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Dev* **125** (8): 1477-1485.

Rajo E, Sharma VK, Kovaleva V, Raikhel NV and Fletcher JC (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**: 969-977.

Sakamoto T, Kamiya N, Ueguchi-Tanaka M, Iwahori S and Matsuoka M (2001) KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev* **15**: 581-590.

Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Samson F, Brunaud V, Balzergue S, Dureucq B, Lepiniec L, Pelletier G, Caboche M, Lecharny A (2002) FLAGdb/FST: a database for mapped flanking insertion sites (FSTs) of *Arabidopsis thaliana* T-DNA transformants. *Nucleic Acids Res* **30** (1): 94-97.

Satina S, Blakeslee AF and Avery AG (1940). Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Am J Bot* **27**: 895-905.

Satina S and Blakeslee AF (1941). Periclinal chimeras in *Datura* in relation to development of leaf and flower. *Am J Bot* **28**: 862-871.

Schmid KJ, Rosleff Sørensen T, Stracke R, Törjék O, Altmann T, Mitchell-Olds T and Weisshaar B (2003) Large-Scale Identification and Analysis of Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphisms for Mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research* **13** (6): 1250-1257.

Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, Fiore C, Cellini F, Theres K (2002) The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *PNAS* **99**: 1064-1069.

Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jurgens G and Laux T (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**: 635-44.

Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K (1999) The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *PNAS* **96**: 290-295.

Shimizu-Sato S and Mori H (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol* **127**: 1405-1413.

Sieber P, Wellmer F, Gheyselincx J, Riechmann JL and Meyerowitz EM (2007) Redundancy and specialisation among plant microRNAs: role of the *MIR164* family in developmental robustness. *Dev* **134**: 1051-1060.

Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T (1998) The *Arabidopsis RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10** (2): 155-169.

Smith LG, Greene B, Veit B and Hake S (1992) A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Dev* **116**: 21-30.

Steeves, TA and Sussex, IM (1989). Patterns in Plant Development. (New York: Cambridge University Press), 895-905.

Stewart RN and Dermen H (1970). Determination of number and mitotic activity of shoot apical initial cells by analysis of mericlinal chimeras. *Am J Bot* **57**: 816-826.

Stirnberg P, Chatfield SP, Leyser HMO (1999) *AXR1* acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **121** (3): 839-847.

Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HM (2002) *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Dev* **129** (5): 1131-41.

Stuurman J, Jäggi F, Kuhlemeier C (2002) Shoot meristem maintenance is controlled by a *GRAS*-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev* **16**: 2213-2218.

Sundaresan V, Springer P, Volpe T, Haward S, Jones JD, Dean C, Ma H and Martienssen R (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev* **9**: 1797-1810.

Takada S, Hibara K, Ishida T, Tasaka M (2001) The *CUP-SHAPED COTYLEDON 1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Dev* **128** (7): 1127-1135.

Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M and Ueguchi C (2003) The *OsTB1* gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J* **33**: 513-520.

Talbert PB, Adler HT, Paris DW, Comai L (1995) The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Dev* **121** (9): 2723-2735.

Tantikanjana T, Yong JWH, Letham DS, Griffith M, Hussain M, Ljung K, Sandberg Sundaresan V (2001) Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the *SUPERSHOOT* gene. *Genes Dev* **15**: 1577-1588.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

Tian C, Wan P, Sun S, Li J and Chen M (2004) Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Mol Bio* **54**: 519-532.

Törjék O, Berger D, Meyer RC, Müssig C, Schmid KJ, Rosleff Sørensen T, Weisshaar B, Mitchell-Olds T and Altmann T (2003) Establishment of a high-efficiency SNP-based framework marker set for *Arabidopsis*. *Plant Journal* **36** (1): 122-140.

Valoczi A, Varallyay E, Kauppinen S, Burgyan J and Havelda, Z (2006) Spatiotemporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *The Plant Journal* **47**, 140-151.

Vaughan (1952). Structure of the angiosperm apex. *Nature* **169**: 468-459.

Venglat SP, Dumonceaux T, Rozwadowski K, Parnell L, Babic V, Keller W, Martienssen R, Selvaraj G and Datla R (2002) The homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *PNAS* **99**: 4730–4735.

Vision TJ, Brown DG and Tanksley SD (2000) The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* **290**: 2114-2117.

Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, Hake S (1991) The developmental gene *Knotted1* is a member of maize homeobox gene family. *Nature* **350**: 241-243.

Williams L, Grigg SP, Xie M, Christensen S and Fletcher J (2005) Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA *miR166g* and its AtHD-ZIP target genes. *Dev* **132**: 3657-3668.

Wisman E, Cardon GH, Fransz P, Saedler H (1998) The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol Biol* **37**: 989-999.

Wilson RN, Heckman JW and Somerville CR (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Phys* **100**: 403-408.

Wyrzykowska J, Schorderet M, Pien S, Gruissem W and Fleming AJ (2006) Induction of Differentiation in the Shoot Apical Meristem by Transient Overexpression of a Retinoblastoma-Related Protein. *Plant Phys* **141**: 1338-1348.

Wyrzykowska J, Pien S, Shen WH and Fleming AJ (2002) Manipulation of leaf shape by modulation of cell division. *Dev* **129**: 957–964.

Zeevaart JAD (1983) Gibberellins and flowering. In *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*: 333–374.

Zhao Y, Medrano L, Ohashi K, Fletcher JC, Yu H, Sakai H and Meyerowitz EM (2004) HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2586–2600.

Zhong R and Ye ZH (1999) *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* **11** (11): 2139-2152.

Zhong R and Ye ZH (2004) *amphivasal vascular bundle 1*, a gain-of-function mutation of the *IFL1/REV* gene, is associated with alterations in the polarity of leaves, stems and carpels. *Plant Cell Physiol* **45**: 369-385.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln-Vogelsang durchgeführt.

8. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen– noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Professor Dr. Klaus Theres betreut worden.

Köln, 18.04.2007

Silke Schulze