

Identifizierung und Charakterisierung
neuer Verzweigungsregulatoren durch Verwendung
natürlicher Variation in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Barbara Nicole Schäfer
aus Karlsruhe

Köln 2012

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in der Abteilung Pflanzenzüchtung und Genetik (Direktor Prof. Dr. Maarten Koornneef) in Köln-Vogelsang angefertigt.

Berichtersteller:

Prof. Dr. Klaus Theres

Prof. Dr. Wolfgang Werr

Tag der mündlichen Prüfung:

23.01.2012

..... *für meine Mutter*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Die Modelnpflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> in der Grundlagenforschung.....	1
1.2. Die Sprossentwicklung höherer Pflanzen	2
1.3. Die Etablierung und der Erhalt des Sprossapikalmeristems	3
1.4. Die genetische Regulation axillärer Meristeme zur Etablierung sekundärer Wachstumsachsen.....	6
1.4.1. Die Anlage von Lateralmeristemen während der pflanzlichen Entwicklung... 9	
1.4.2. Der Einfluss der Tageslänge auf die Anlage von Lateralmeristemen	9
1.5. Die Regulation des Blühzeitpunkts höherer Pflanzen	10
1.6. Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Material	14
2.1.1. Chemikalien	14
2.1.2. Puffer, Lösungen und Kulturmedien.....	14
2.1.3. Verbrauchsmaterial	14
2.1.4. Enzyme.....	15
2.1.5. Antikörper	15
2.1.6. Oligonukleotide.....	15
2.1.7. Pflanzen.....	18
2.1.8. Software und Datenbanken	18
2.2. Methoden	20
2.2.1. Isolierung genomischer DNA.....	20

2.2.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.2.3.	Aufreinigung von PCR Produkten	21
2.2.4.	Restriktionsverdau von PCR-Produkten	21
2.2.5.	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.6.	Genetische Kartierung	21
2.2.6.1.	Grobkartierung	21
2.2.6.2.	Feinkartierung	23
2.2.7.	Sequenzierung	23
2.2.8.	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	24
2.2.8.1.	Pflanzenmaterial	24
2.2.8.2.	Isolierung, Präzipitation und Aufreinigung von RNA aus Pflanzen	24
2.2.8.3.	Quantifizierung von RNA	24
2.2.8.4.	cDNA Synthese	24
2.2.8.5.	qRT-Experiment	25
2.2.8.6.	Daten-Auswertung	25
2.2.9.	RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	25
2.2.9.1.	RNA- <i>in-situ</i> -Sonden	25
2.2.9.2.	Vorbereitung und Durchführung der RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	25
2.2.10.	Wachstumsbedingungen für Pflanzen	26
2.2.11.	Kreuzung von <i>Arabidopsis</i> Pflanzen	27
2.2.12.	Phänotypische Charakterisierung der Seitentriebbildung	27
2.2.13.	Analyse des Blühzeitpunkts	27
3.	Ergebnisse	28
3.1.	„Second-Site Modifier Screen“ zur Identifikation neuer Verzweigungs- regulatoren	28
3.1.1.	Phänotypische Charakterisierung der <i>las</i> Kreuzungen zu verschiedenen <i>Arabidopsis</i> Ökotypen	28
3.1.1.1.	Phänotypische Charakterisierung der Seitentriebentwicklung verwendeter Ökotypen	29
3.1.1.2.	Phänotypische Charakterisierung der <i>las</i> Kreuzungspopulationen	31
3.1.1.3.	Phänotypische Charakterisierung der Kreuzungspopulationen unter Langtagbedingungen	34

3.1.2.	Phänotypische Analyse der 1. Rückkreuzungsgeneration (BC1F1)	36
3.1.3.	Phänotyp des <i>las</i> „Enhancers“ aus dem Ökotyp C24.....	40
3.1.4.	Grobkartierung des <i>las</i> Enhancers aus C24.....	43
3.1.5.	Feinkartierung des <i>las</i> Enhancers aus C24 in Rückkreuzungspopulationen..	46
3.1.6.	Der Blühzeitpunktregulator <i>FRIGIDA</i> als Kandidatengen	52
3.1.7.	Allele der Blühzeitpunktregulatoren <i>FRIGIDA</i> und <i>FLC</i> in Columbia und C24	53
3.2.	Analysen zur Interaktion zwischen Verzweigungs- und Blühzeitpunkt- regulatoren	58
3.2.1.	Phänotypische Analyse von Doppel- und Dreifachmutanten	58
3.2.1.1.	Phänotypische Charakterisierung der Linien <i>las FRI</i> und <i>las rax1 FRI</i> .	58
3.2.1.2.	Phänotypische Charakterisierung von <i>las co</i> und <i>las rax1 co</i> Mutanten	63
3.2.1.3.	Phänotypische Charakterisierung der <i>las lfy</i> Doppelmutante	68
3.2.2.	Genetische Analysen zur Interaktion von <i>LAS</i> , <i>RAX1</i> und <i>LFY</i>	72
3.2.2.1.	Analyse der gewebespezifischen <i>RAX1</i> Expression in Apices von <i>leafy</i> Mutanten.....	72
3.2.2.2.	Quantitative <i>LAS</i> und <i>RAX1</i> Expressionsanalysen in Apices von <i>leafy</i> Mutanten.....	77
4.	Diskussion.....	81
4.1.	Die Kartierung von <i>FRIGIDA</i> als Verzweigungsregulator.....	81
4.2.	Der Einfluss der Blühzeitpunktregulatoren <i>FRIGIDA</i> und <i>CONSTANS</i> auf die Anlage axillärer Meristeme	85
4.3.	<i>LEAFY</i> besitzt eine Funktion bei der Anlage axilläre Meristeme während der reproduktiven Entwicklung.....	88
4.4.	<i>RAX1</i> definiert die adaxialen und abaxialen Grenzbereiche des Blütenmeristems .	90
4.5.	Blühzeitpunktregulatoren kontrollieren die Anlage axillärer Meristeme durch Regulation von <i>LAS</i> und <i>RAX1</i> während der reproduktiven Entwicklung	92
5.	Literaturverzeichnis	93

Zusammenfassung	100
Abstract	102
Danksagung.....	104
Eidesstattliche Erklärung	105

Abkürzungsverzeichnis

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

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADF8	ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 8
An-1	Ökotyp Antwerpen
ANT	AINTEGUMENTA
AP1	APETALA 1
AS	Aminosäure
ATG	Startcodon
AtRH8	<i>Arabidopsis thaliana</i> DEAD-box RNAhelicase-like 8
AXR1	AUXIN RESISTANT 1
BC1F1	1. Tochtergeneration der 1. Rückkreuzung
BC3F2	2. Tochtergeneration der 3. Rückkreuzung
bp	Basenpaare
BSA	bulk segregant analysis
C	Cytosin
C24	Ökotyp C24
CAL	CAULIFLOWER
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequences
cb	cryptic bract = reduziertes Hochblatt
CBP20	CAP BINDING PROTEIN 20
cDNA	Komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
CLV	CLAVATA
cM	centi Morgan
CO	CONSTANS
Col-0	Ökotyp Columbia
CUC	CUP-SHAPED COTELYDON
Cvi	Ökotyp Cape Verde Islands
d	days/ Tage
dCAPS	derived cleaved amplified polymorphic sequences
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-desoxyribonukleosid 5'triphosphat
DTF	Tage bis zur Blüte
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOL5	ENHANCER OF LATERAL SUPPRESSOR 5

Eri	Ökotyp Eringsboda
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FES1	FRIGIDA ESSENTIAL1
FLC	FLOWERING LOCUS C
FLX	FRIGIDA EXPRESSOR
FM	Blütenmeristem
FRI	FRIGIDA
FRI-C	FRIGIDA-Proteinkomplex
FRL1	FRIGIDA LIKE1
FT	FLOWERING LOCUS T
FUL	FRUITFUL
G	Guanin
GA	gibberellic acid
IM	Infloreszenzmeristem
kb	Kilobasen
KNOX	knotted-like 1 homeobox
Kyo	Ökotyp Kyoto
LAS	LATERAL SUPPRESSOR in <i>Arabidopsis</i>
LD	Langtag
Ler	Ökotyp Landsberg <i>erecta</i>
LFY	LEAFY
Ls	LATERAL SUPPRESSOR in Tomate
MPIPZ	Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung
mRNA	Boten-RNA
MSAT	Mikrosatellit
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H-Ionenkonzentration
PNF	POUND-FOOLISH
PNY	PENNYWISE
Pos.	Position
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
QTL	quantitative trait loci
RAM	Wurzelapikalmeristem
RAX	REGULATOR OF AXILLARY MERISTEM
RLN	Rosettenblätter bis zur Blüte
RNase	Ribonuklease
ROX	REGULATOR OF AXILLARY MERISTEM FORMATION
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SAM	Sprossapikalmeristem
SD	Kurztag
SF-2	Ökotyp San-Feliu-2
Sha	Ökotyp Shahdara

SNP	single nucleotide polymorphism
SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1
SPR	SNP probe ratios
STM	SHOOT MERISTEMLESS
SUF4	SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4
SVP	SHORT VEGETATIVE PHASE
SWR1-C	SWR1-Proteinkomplex
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAF14	TATA binding protein-Associated Factor 14
TE	Tris-EDTA
TSF	TWIN SISTER OF FT
U	Units
WUS	WUSCHEL
YAB1	YABBY1
Zu-0	Ökotyp Zürich

Abkürzungen der Aminosäuren, Abb. 3-12 (B):

D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
G	Glycin
I	Isoleucin
L	Leucin
M	Methionin
P	Prolin
Q	Glutamin
S	Serin
V	Valin
Y	Tyrosin

1. Einleitung

1.1. Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* in der Grundlagenforschung

Arabidopsis thaliana (L.) Heyhn ($2n=10$), auch Acker-Schmalwand oder Schotenkresse genannt, ist eine unscheinbare, einjährige Pflanze der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae) und ist verwandt mit wirtschaftlich wichtigen Kulturen wie Raps oder Senf. Sie besitzt ein, seit dem Jahr 2000 vollständig sequenziertes, relativ kleines Genom mit 125 Megabasen und nur fünf Chromosomen. Das Genom, die geringe Pflanzengröße, sowie der kurze Regenerationszyklus und die einfache Kultivierung machten *Arabidopsis thaliana* in den letzten 50 Jahren zu der Modellpflanze für Genetiker. *A. thaliana* ist weltweit verbreitet und kann bspw. auf sandigen Böden, an Flussufern und Straßenrändern in verschiedenen Umwelten sogar bis in einer Höhe von ca. 4000 Metern über dem Meeresspiegel gefunden werden (Koorneef *et al.*, 2004; Shindo *et al.*, 2007). Diese immense Anpassungsfähigkeit und die große phänotypische Variabilität zwischen verschiedenen *Arabidopsis* Ökotypen sind das Ergebnis einer großen genetischen Variation innerhalb des Genoms. Während der letzten Jahrzehnte wurden Hunderte dieser Ökotypen zu Forschungszwecken gesammelt und öffentlich zugänglich gemacht. Auf diese Weise konnte auch der Ökotyp Zürich (Zu-0) identifiziert werden, der einen Defekt in der Anlage von Lateralmeristemen zeigt (Kalinina *et al.*, 2002). Diese enormen Ressourcen stellen ein nützliches Werkzeug dar und bieten die Möglichkeit Gen- und Proteinfunktionen zu studieren, aber erlauben ebenso Einblicke in die pflanzliche Entwicklung oder in Bereiche wie Evolutions- und Populationsgenetik innerhalb und zwischen verschiedenen Arten und Populationen. Zur Analyse der genetischen Mechanismen welche der phänotypischen Variation zugrunde liegen, wurden die Erstellung von *knock-out* Linien, die Analyse von QTLs (*quantitative trait loci*) und Kartierungspopulationen, sowie die Erfassung und Auswertung genetischen SNP Informationen als vielseitig einsetzbare Methoden genutzt (Koorneef *et al.*, 2004; Shindo *et al.*, 2007).

Zur Identifikation redundant wirkender oder alternativer Stoffwechselwege zu bereits identifizierten Signalwegen, wurden vielfach so genannte „*second-site modifier screens*“ verwendet (Page and Grossniklaus, 2002). Hierbei wird im mutanten Hintergrund eines bereits identifizierten Gens, bspw. eine T-DNA, Transposon- oder EMS-Mutagenese

durchgeführt und die Nachkommenschaft auf Verstärker oder Revertanten des untersuchten Phänotyps getestet. Der limitierende Faktor ist hierbei der genetische Hintergrund der verwendeten Mutante, da Nullallele, deren funktionelle Produkte in der gesuchten Signaltransduktionskette involviert wären, in dem verwendeten Ökotyp nicht aufgedeckt werden könnten (Page and Grossniklaus, 2002). So wurde beispielsweise *FRIGIDA*, einer der wichtigsten Blühzeitpunktregulatoren in *Arabidopsis thaliana*, nicht in den üblich verwendeten Ökotypen Columbia (Col-0) oder Landsberg *erecta* (*Ler*) entdeckt, sondern durch natürlich vorkommende Variation in spätblühenden Ökotypen (Koorneef *et al.*, 2004; Shindo *et al.*, 2007). Die Kombination von „*second-site modifier screens*“ und der natürlich vorkommenden, genetischen Variation verschiedener *Arabidopsis* Ökotypen bietet damit ein nützliches Werkzeug zur Identifikation neuer, genetischer Faktoren, in redundant oder alternativ wirkenden Stoffwechselwegen.

1.2. Die Sprossentwicklung höherer Pflanzen

Die Entwicklung höherer Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* ist in verschiedene Wachstumsphasen aufgeteilt, in denen abhängig von exogenen und endogenen Faktoren unterschiedliche, laterale Organe gebildet werden. So schließt sich an die Embryogenese und die darauffolgende Keimung eine rein vegetative Wachstumsphase, die lediglich der Zunahme von Größe und der Akkumulierung von Energie zur Umstellung auf die reproduktive Phase dient. Dabei unterscheidet sich die Entwicklung von Pflanzen und tierischen Organismen entscheidend. Während bei tierischen Organismen mit der Embryogenese alle notwendigen Organe vollständig angelegt werden, teilt sich die pflanzliche Entwicklung in eine embryogene und eine post-embryogene Phase.

Während der Embryogenese höherer Pflanzen werden neben den Keimblättern und dem Hypokotyl, auch die primären Meristeme angelegt, das Sprossapikalmeristem (*shoot apical meristem*, SAM) und das Wurzelapikalmeristem (*root apical meristem*, RAM). Das Spross- und das Wurzelapikalmeristem sind an entgegengesetzten Polen der Pflanze lokalisiert und bestehen aus Gruppen undifferenzierter Zellen, die das lebenslange Wachstum der Pflanze bestimmen. Im Laufe der pflanzlichen Entwicklung wird das Wachstum im Allgemeinen durch Zellteilung jener Stammzellen gewährleistet, die ihre Tochterzellen stetig an den Pflanzenkörper abgeben. Dadurch wird zum einen die Bildung

von Wurzel- und Sprossgewebe gewährleistet und zum anderen die Bildung von Organen wie Blättern, Seitentrieben und Blüten ermöglicht. Hierbei bildet das Wurzelapikalmeristem den gesamten unterirdischen Teil der Pflanze aus, wohingegen das gesamte oberirdische Pflanzengewebe auf die Aktivität des Sprossapikalmeristems zurückgeführt werden kann.

Während der post-embryonalen Entwicklung wird die Sprossarchitektur von Pflanzen durch die Bildung von Blättern entlang der Sprossachse und durch die Anzahl sekundärer Wachstumsachsen, so genannter Seitentriebe, in Achseln von Blättern bestimmt. Dabei ist die vegetative Wachstumsphase der Pflanze durch die Bildung von Blattprimordien am SAM geprägt. Im Verlauf der Blühinduktion verändert sich die Identität des SAM und es kommt zu einer Umstellung des vegetativen Sprossapikalmeristems zu einem reproduktiven Infloreszenzmeristem (IM). In *Arabidopsis* bildet das IM nach der Blühinduktion zunächst Blätter und in der späten Entwicklung ausschließlich Blüten. Zusätzlich werden während der gesamten Entwicklung sekundäre, so genannte axilläre oder laterale Meristeme (AM) in den Achseln von Blättern angelegt, die zur Bildung von Knospen führen. Diese Achselknospen bleiben entweder dormant, oder treiben aus und bilden dadurch die Grundlage für die Etablierung sekundärer Wachstumsachsen. Die Bildung der Sprossarchitektur folgt dabei dem genetisch festgelegten Bauplan der Pflanze und ist in der Regel von einem modularen Aufbau geprägt. Die Phytomer oder auch Metamer genannten Untereinheiten der Sprossachse, wiederholen sich fortlaufend entlang des oberirdischen Pflanzenkörpers und bestehen aus einem Blatt, dem zugehörigen, in der Blattachsel angelegten Seitentrieb und dem angrenzenden Stängelabschnitt, welcher als Internodium bezeichnet wird (Steeves and Sussex, 1989; Sussex and Kerk, 2001). Umwelteinflüsse wie Temperatur, Lichtverhältnisse und Nährstoffangebot können einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Sprossarchitektur ausüben.

1.3. Die Etablierung und der Erhalt des Sprossapikalmeristems

Das vegetative Sprossapikalmeristem in *Arabidopsis* besitzt eine Größe von ungefähr $40\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$ und ist repräsentativ für die meisten dikotylen Pflanzen, wobei die Größe des Meristems in anderen Spezies variieren kann (Barton, 2010). Das SAM in *Arabidopsis* besteht aus zwei äußeren Zellschichten, der L1- und L2-Schicht, in denen Zellteilungen

fast ausschließlich antiklin, also senkrecht zur Oberfläche ablaufen, sowie einer inneren L3-Schicht, deren Zellen durch perikline Teilung an den Pflanzenkörper abgegeben werden (Abb. 1-1). Die zentrale Zone (*central zone*, CZ) in der Mitte des Meristems, enthält die für das Wachstum verantwortlichen meristematischen Zellen, und wird seitlich durch die periphere Zone und unterhalb durch das Rippenmeristem begrenzt. Bei der Zellteilung der meristematischen Zellen, werden die L3-Tochterzellen einerseits zur Initiation lateraler Organe in die umliegende periphere Zone abgegeben, und zum anderen zur Regeneration von Sprossgewebe an das Rippenmeristem (Barton, 2010; Rieu and Laux, 2009).

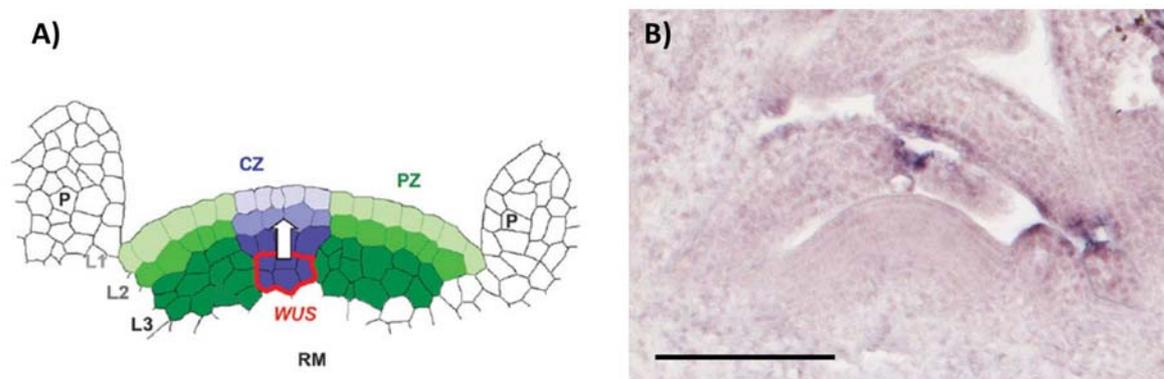


Abb. 1-1: Organisation des vegetativen Sprossapikalmeristems in *Arabidopsis thaliana*.

(A) zellulärer Aufbau des vegetativen SAM. L1, L2, L3 = äußere und innere Zellschichten; P = Blattprimordium; CZ = zentrale Zone; PZ = periphere Zone; RM = Rippenmeristem; Quelle: Sablowski, 2007. (B) Querschnitt eines vegetativen Apex des Ökotyp Columbia. Maßstab 100µm.

Die Funktionalität eines Meristems während der pflanzlichen Entwicklung verlangt ein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen der meristematischen Stammzellpopulation und differenzierenden Zellen in der Peripherie des Meristems. Die meristematische Zellaktivität des SAM wird zum einen durch Aktivität der *KNOX* (*knotted-like1 homeobox*) Transkriptionsfaktoren der Klasse I, wie beispielsweise *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) aufrechterhalten, und zum anderen innerhalb der zentralen Zone durch die antagonistische Wirkung der Gene *WUSCHEL* (*WUS*) und *CLAVATA* (*CLV*) (Miwa *et al.*, 2009; Rieu and Laux, 2009).

STM ist im Apex in allen undifferenzierten Zellen exprimiert und kann bereits in den jüngsten Blattprimordien „P0“ nicht mehr nachgewiesen (Long and Barton, 2000; Reiser *et al.*, 2000). In *stm* Mutanten ist einerseits die Aufrechterhaltung des funktionellen Meristems gestört und Mutanten zeigen darüber hinaus fusionierte Keimblätter (Barton, 2010; Rieu and Laux, 2009). Letzteres lässt eine Funktion von *STM* bei der Separierung von Organen vermuten. Das mutante Allel *gorgon* wiederum besitzt eine Mutation in der Homöobox des *STM* Gens und führt zu einem vergrößerten SAM und einem Defekt in der Anlage axillärer Meristeme in Rosetten- und Stängelblattachsen (Takano *et al.*, 2010). Ebenso konnte ein Seitentriebdefekt in Stängelblattachsen von Pflanzen mit dem schwachen *stm-10* Allel beschrieben werden, welches zu einem STOP-Codon in der ersten Helix der Homöodomäne führt (Smith *et al.*, 2011). Studien zeigten, dass die *STM*-vermittelte Aufrechterhaltung der meristematischen Zellaktivität vermutlich durch einen positiven, so genannten *feedback loop* mit dem Pflanzenhormon Cytokinin gewährleistet wird (Barton, 2010). Dabei führt die Aktivierung von *KNOX* Genen wie *STM*, zur Aktivierung von Genen der Cytokinin-Biosynthese. In Reis konnte gezeigt werden, dass das Cytokinin-aktivierende Enzym LONELY GUY notwendig ist zur Akkumulation von *KNOX* Transkripten im Meristem (Barton, 2010; Rieu and Laux, 2009). Zusätzlich zu den steigenden Cytokinin-Level im Meristem, reduziert *STM* im Gegenzug die Level des Pflanzenhormons Gibberellinsäure (GA; engl.: Gibberellic Acid), welches für die Differenzierung und das Wachstum von Organen zuständig ist (Rieu and Laux, 2009).

Zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen sind *KNOX* Proteine auf die Bildung von Heterodimeren mit BEL1-ähnlichen Homöodomäne (BLH) Proteinen angewiesen (Cole *et al.*, 2006; Bellaoui *et al.*, 2001). Die BLH Proteine ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX1 (ATH1), PENNYWISE (PNY) und POUND-FOOLISH (PNF) interagieren mit *STM* und Dreifachmutanten dieser drei BLH Proteine spiegeln den mutanten *stm* Phänotyp wieder (Smith *et al.*, 2011; Barton, 2010; Rutjens *et al.*, 2009). *PNY* und *PNF* Transkripte akkumulieren in der zentralen und peripheren Zone des SAM, wobei deren genaue Funktion während der pflanzlichen Entwicklung zur Erhaltung der meristematischen Zellaktivität bislang unklar ist (Ung *et al.*, 2011; Rutjens *et al.*, 2009). Analysen von *pny pnf* Doppelmutanten während der reproduktiven Entwicklung ließen unter anderem Defekte bei der Bildung von Blüten- und Lateralmeristemen erkennen und zeigten beeinträchtigte Aktivitäten der Blühzeitpunktregulatoren *LEAFY* (*LFY*) und *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Kanrar *et al.*, 2008).

Die Regulation der Stammzellpopulation innerhalb der zentralen Zone wird durch antagonistische Wirkung der Gene *WUS* und *CLV* in einem negativen *feedback loop* gewährleistet (Barton, 2010; Rieu and Laux, 2009; Miwa *et al.*, 2009). *WUSCHEL*, ein Homöodomäne-enthaltender (HD) Transkriptionsfaktor, ist in Zellen der L3-Schicht, genauer in dem so genannten *organizing center* (OC) des Meristems exprimiert und fördert nicht-zellautonom die Stammzellaktivität in der zentralen Zone (Abb. 1-1; Laux *et al.*, 1996; Schoof *et al.*, 2000; Barton, 2010). Der GATA-3-ähnliche Transkriptionsfaktor *HANABA TARANU* (*HAN*) wirkt hierbei nicht-zellautonom und kontrolliert die Anzahl, sowie die korrekte Positionierung der *WUS*-exprimierenden Zellen (Miwa *et al.*, 2009). *WUSCHEL* hingegen aktiviert *CLV3* und ist notwendig für dessen korrekte Positionierung im Meristem (Schoof *et al.*, 2000; Rieu and Laux, 2009; Barton, 2010).

CLAVATA3 (*CLV3*) codiert für ein aus 96 Aminosäuren bestehendes Protein, das ein sekretorisches Glykopeptid aus 13 Aminosäuren beinhaltet. Dieses ist oberhalb der *WUS* Expressionsdomäne in Zellen der L1- und L2-Schicht aktiv und wirkt nicht-zellautonom zur Reprimierung der Stammzellaktivität (Barton, 2010; Rieu and Laux, 2009). Dabei bindet *CLV3* als Ligand an Homodimere der Rezeptorkinase *CLV1*, und möglicherweise an den Rezeptorkomplex *CLV2-CORYNE*, deren aktivierte Signalkaskade negativ die *WUS* Expression in Zellen des *organizing center* (OC) reguliert (Barton, 2010; Miwa *et al.*, 2009; Rieu and Laux, 2009).

1.4. Die genetische Regulation axillärer Meristeme zur Etablierung sekundärer Wachstumsachsen

Die Initiation axillärer Meristeme wird während der Entwicklung durch eine Reihe verschiedener Gene reguliert. Studien in Tomate und *Arabidopsis* konnten zeigen, dass das Gen *LATERAL SUPPRESSOR* (*Ls/ LAS*) einen essentiellen Einfluss auf die Anlage lateraler Meristeme während der vegetativen Entwicklung besitzt und *ls/ las* Mutanten bilden keine Lateralmeristeme während des vegetativen Wachstums (Schumacher *et al.*, 1999; Greb *et al.*, 2003). *LAS* kodiert für einen möglichen transkriptionellen Regulator der pflanzenspezifischen *GRAS*-Genfamilie und akkumuliert in der interprimordialen Region zwischen dem SAM und sich entwickelnden Primordien von P1 bis P20/22 (Greb *et al.*, 2003). Dabei überlappt die *LAS* Expressionsdomäne in Achseln von P1 bis P15 mit der von *STM* (Greb *et al.*, 2003). Die in älteren Blattachsen beobachtete Fokussierung der *STM*

Expression auf eine kleine Gruppe von Zellen in der Blattachsel, ist in *las* Mutanten nicht nachweisbar (Greb *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass *LAS* zur Aufrechterhaltung der meristematischen Zellaktivität axillärer Meristeme notwendig ist (Greb *et al.*, 2003). Während der reproduktiven Entwicklung in *Arabidopsis* akkumulieren *LAS* Transkripte in Blattachsen von Stängelblättern und Blüten, sowie interprimordial zwischen Sepalen, Petalen und Karpellen (Raatz, 2009). Trotz der nachgewiesenen Expression zeigen *las* Mutanten in *Arabidopsis* während der reproduktiven Phase keinen Blüten- oder Verzweigungsdefekt, wohingegen die *ls* Mutante in Tomate einen Defekt bei der Petalenbildung, sowie eine reduzierte Fertilität aufweist (Greb *et al.*, 2003; Groot *et al.*, 1994).

Goldshmidt *et al.* wiesen nach, dass die *LAS* Expression in *yabby* Mutanten während der reproduktiven Entwicklung im IM reduziert ist. Gene der *YABBY*-Familie sind im abaxialen Bereich von Blattprimordien exprimiert und steuern dort, durch Reprimierung von *KNOX* Transkriptionsfaktoren der Klasse I, die abaxiale Entwicklung von Blattprimordien (Barton, 2010; Goldshmidt *et al.*, 2008; Yang, 2007). Einzelmutanten des Gens *YABBY1* (*YAB1*) zeigen neben einer veränderten Phyllotaxis, eine veränderte Expression der Gene *WUS* und *CLV3*, welches eine nicht-zellautonom wirkende Signalkette vermuten lässt, die aus dem Blatt auf Gene der zentralen Zone des SAM wirkt (Goldshmidt *et al.*, 2008). Zusätzlich besitzen *yab1* Einzelmutanten einen Defekt in der Anlage axillärer Meristeme in jungen Rosetten- und Stängelblattachsen (Yang, 2007). Weitere Analysen von Goldshmidt *et al.* lassen vermuten, dass *YAB1*, welches selbst zellautonom wirkt, ein nicht-zellautonomes Signal aus dem Blatt vermittelt, das über *LAS* die Positionierung der Blattachsel und dadurch die Grenze zwischen dem meristematischen Zellbereich des SAM und dem Primordium in der peripheren Zone bestimmt (Goldshmidt *et al.*, 2008; Barton, 2010). Im Gegensatz zu den *YABBY* Genen fördern HD-ZIP Transkriptionsfaktoren der Klasse III, wie *REVOLUTA* (*REV*), *PHABULOSA* (*PHB*) und *PHAVOLUTA* (*PHV*), die adaxiale Entwicklung von Blattprimordien (Rieu and Laux, 2009; Schmitz and Theres, 2005; McSteen and Leyser, 2005). Mutationen in diesen Genen führen zu einem abweichenden Verzweigungsmuster vom Wildtyp und lassen einen Einfluss dieser Gene auf die Anlage von Lateralmeristemen vermuten.

Ähnlich zu *LAS* haben auch die R2R3 Myb-Transkriptionsfaktoren *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMI* (*RAX1*), *RAX2* und *RAX3*, einen Einfluss auf die Anlage axillärer

Meristeme (Müller *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2006). Analysen von Einzel- und Doppelmutanten ließen eine überlappende Funktion der *RAX* Gene während der vegetativen und der frühen reproduktiven Entwicklung entlang der Sprossachse erkennen. *RAX1* besitzt hierbei den größten Einfluss und *rax1-3* Einzelmutanten zeigen einen Defekt in den ältesten Rosettenblattachsen während der frühen vegetativen Entwicklung (Müller *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2006). Während *RAX2* und *RAX3* zur Initiation axillärer Meristeme in der mittleren und späten vegetativen Phase redundant wirken, besitzen *rax1 rax2 rax3* Dreifachmutanten zusätzlich einen Seitentriebdefekt in den ältesten Stängelblattachsen (Müller *et al.*, 2006). Neben der Initiation axillärer Meristeme sind die *RAX* Gene auch zur Aufrechterhaltung der meristematischen Zellaktivität in Lateralmeristemen notwendig (Müller *et al.*, 2006). *In-situ*-Hybridisierungen von *RAX1* offenbarten ein ähnliches Expressionsmuster wie *LAS* im adaxialen Grenzbereich zwischen dem SAM und sich entwickelnden Blattprimordien (Müller *et al.*, 2006). Die *las rax1* Doppelmutante besitzt zu dem *las*-vermittelten Verzweigungsdefekt in Rosettenblattachsen, auch eine gestörte Anlage von Lateralmeristemen in Stängelblattachsen (Müller *et al.*, 2006). Weitere Studien zur Interaktion von *LAS* und *RAX1* zeigten, dass die *RAX* Gene und *LAS* die Initiation von Lateralmeristemen entlang der Sprossachse in zwei partiell, redundanten Stoffwechselwegen regulieren.

Die *CUP-SHAPED COTELYDON (CUC)* Gene kodieren für NAC-Domäne enthaltende Transkriptionsfaktoren und Expressionsstudien zeigten, dass die Aktivität von *CUC2* in Blattachsen abhängig ist von *RAX1* (Keller *et al.*, 2006). Die *CUC* Gene *CUC1*, *CUC2* und *CUC3* besitzen eine Funktion bei der Initiation des SAM durch die Regulation von *STM*, und sind für die Separierung von Organen notwendig (Barton, 2010; Raman *et al.*, 2008). Darüber hinaus besitzen die *CUC* Gene eine Funktion bei der Anlage axillärer Meristeme (Raman *et al.*, 2008). Raman *et al.* zeigten, dass die redundante Aktivität von *CUC1* und *CUC2* die Initiation von Lateralmeristemen durch Interaktion mit *LAS* reguliert, wohingegen *CUC3* einen *LAS*-unabhängigen Einfluss hat.

Kürzlich konnte für den R2R3 Myb-Transkriptionsfaktor *RAX1* eine Interaktion mit *REGULATOR OF MERISTEM FORMATION (ROX/ bHLH140)*, ein Transkriptionsfaktor der bHLH-Genfamilie, *in vitro* nachgewiesen werden (Yang, 2007). Einzelmutanten des Transkriptionsfaktors *ROX* besitzen einen Defekt während der vegetativen Entwicklung und sind in der Lage die Verzweigungsdefekte von *rax1* und *las rax1*

Mutanten zu verstärken (Yang, 2007). Studien zeigten, dass die Aktivität von *ROX* abhängig ist von *RAX1* und *LAS* und dass die Interaktion dieser Verzweigungsregulatoren die Anlage von Lateralmeristemen während der vegetativen und reproduktiven Entwicklung reguliert (Yang, 2007).

1.4.1. Die Anlage von Lateralmeristemen während der pflanzlichen Entwicklung

Die Anlage von Lateralmeristemen wird während der pflanzlichen Entwicklung unterschiedlich reguliert. Während der vegetativen Phase der Entwicklung folgt die Initiation axillärer Meristeme einem akropetalen Gradienten und Lateralmeristeme werden zuerst in älteren Blattachsen mit einem größeren Abstand zum Sprossapikalmeristem angelegt (Grbic and Bleecker, 1996). Nach der Blühinduktion ändert sich dieses Muster und axilläre Meristeme werden entweder zeitgleich initiiert (Stirnberg *et al.*, 1999, 2002), oder entlang eines basipetalen Gradienten, wobei Lateralmeristeme zuerst in Blattachsen nahe dem SAM angelegt werden (Hempel and Feldman, 1994; Grbic and Bleecker, 1996). Während der reproduktiven Phase der Entwicklung wird das Auswachsen der Knospen durch einen basipetalen Gradienten kontrolliert, beginnend mit Knospen in den jüngsten Blattachsen (Hempel and Feldman, 1994; Grbic and Bleecker, 1996; Stirnberg *et al.*, 1999, 2002). Unabhängig vom Auswachsen der Knospen wird deutlich, dass die Initiation axillärer Meristeme während der pflanzlichen Entwicklung durch unterschiedliche genetische Faktoren bestimmt werden muss, und dass der Vorgang der Blühinduktion einen entscheidenden Einfluss auf diesen Prozess ausübt.

1.4.2. Der Einfluss der Tageslänge auf die Anlage von Lateralmeristemen

In der bestehenden Literatur wird die Ausprägung einiger Verzweigungsphänotypen in Abhängigkeit einer langen vegetativen Entwicklungsphase der Pflanzen durch Wachstum in kurzen Photoperioden beschrieben (Clarenz, 2004; Müller *et al.*, 2006; Yang, 2007; Raatz, 2009). So ist beispielsweise die Verstärkung des *las* Verzweigungsdefekts in Pflanzen der Doppelmutante *las-4 eol5* (*enhancer of lateral suppressor 5*), einer möglichen Histonmethyltransferase genannt *CZS*, nur dann sichtbar, wenn Pflanzen mindestens sechs Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen wurden (Raatz, 2009). Mutationen in Genen der R2R3 Myb-Transkriptionsfaktoren *RAX1*, *RAX2* und *RAX3* äußern sich in einer

unterdrückten Anlage axillärer Meristeme während der vegetativen und frühen reproduktiven Entwicklungsphase der Pflanze. Dabei ist die Ausprägung des Phänotyp ebenfalls stark abhängig vom Wachstum in kurzen Photoperioden und Einzel-, Doppel-, und Dreifachmutanten zeigen unter Langtagbedingungen keinen Verzweigungsdefekt (Müller *et al.*, 2006; Yang, 2007). Pflanzen mit mutanten Allelen des Gens *ROX* hingegen, einem bHLH-Transkriptionsfaktor, zeigen einen Seitentriebdefekt in den ältesten Rosettenblattachsen, wobei die Anzucht der Pflanzen in kurzen Photoperioden die Ausprägung des Phänotyps verstärkt (Yang, 2007). Analysen von Pflanzen des mutanten Allels *fil-8*, welches eine Mutation im Gen *YABI* besitzt, ließen ebenfalls einen Kurztag-abhängigen Verzweigungsdefekt erkennen (Yang, 2007). Die offensichtliche Korrelation zwischen einer späteren Blüte der Pflanzen unter Kurztagbedingungen, sowie den beschriebenen Verzweigungsdefekten besonders während der reproduktiven Entwicklung, wie in *rax* Dreifach-, und *las eol5* Doppelmutanten, lässt den Einfluss unbekannter, tageslängen-abhängiger Faktoren vermuten.

1.5. Die Regulation des Blühzeitpunkts höherer Pflanzen

Innerhalb der gesamten pflanzlichen Entwicklung bildet das SAM laterale Organe in der Peripherie des Meristems. Während der reproduktiven Entwicklung bildet das Infloreszenzmeristem (IM) Blattprimordien, in deren Achseln wiederum, als Lateralmeristeme, sekundäre IMs und Blütenmeristeme angelegt werden (Long and Barton, 2000). Hierbei werden Blütenmeristeme als Bestandteil des Blütenprimordiums, in Achseln von reduzierten Hochblättern, so genannten „*cryptic bracts*“, initiiert (Long and Barton, 2000). Blütenmeristeme unterscheiden sich jedoch grundlegend von üblichen Lateralmeristemem, da ihre meristematische Aktivität nicht aufrechterhalten werden kann und ihr Wachstum nach der Bildung von Blütenorganen eingestellt wird (Irish, 2010).

Die Regulation des Blühzeitpunkts erfolgt durch Veränderung der Meristemidentität und wird in *Arabidopsis* durch sechs redundante, interagierende Stoffwechselwege reguliert, die endogene und umweltbedingte Signale zur Blühinduktion weiterleiten (Wellmer and Riechmann, 2010; Srikanth and Schmid, 2011; Imaizumi, 2011). Dabei wirken die vermittelten Signale entweder reprimierend oder fördernd auf die so genannten „*floral intergrator genes*“ *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)*, *FT*

und *FD*, jene Gene die die Signale der interagierenden Stoffwechselwege zur Blühinduktion weiterleiten.

Der tageslängenabhängige Stoffwechselweg fördert über den B-Box Transkriptionsfaktor *CONSTANS* (CO) die Blühinduktion. Die Aktivität von *CONSTANS* wird zum einen transkriptionell reguliert durch Gene der zirkadianen Uhr die den Tageszyklus bestimmen, und zum anderen auf Proteinebene durch tageslängenabhängige Signale der Phytochrom und Cryptochrom Photorezeptoren (Jarillo and Pineiro, 2011; Srikanth and Schmid, 2011; Imaizumi, 2011). Unter Langtagbedingungen fördert das Protein CO in Blättern die Expression des Gens *FT* und dessen Homolog *TWIN SISTER OF FT* (*TSF*), die wiederum nach Transport ins Sprossapikalmeristem durch direkte und indirekte Aktivierung der Blütenmeristem-Identitätsgene *LFY*, *APETALA1* (*API*), *CAULIFLOWER* (*CAL*) und *FRUITFUL* (*FUL*) die Blühinduktion vermitteln (Jarillo and Pineiro, 2011; Srikanth and Schmid, 2011; Imaizumi, 2011). Das Wachstum der Pflanzen unter kurzen Photoperioden hat die Instabilität des *CONSTANS* Proteins zur Folge, wodurch keine Signale zur Blühinduktion aus diesem Stoffwechselweg weitergeleitet werden können (Simpson and Dean, 2002; Srikanth and Schmid, 2011). *constans* Mutanten sind somit nur unter Langtagbedingungen, nicht jedoch unter kurzen Photoperioden extrem spätblühend (Simpson and Dean, 2002).

Unter Kurztagbedingungen fördert das Hormon GA über den hormonabhängigen Stoffwechselweg die Blühinduktion, wobei für GA unter Langtagbedingungen derzeit auch eine fördernde Wirkung durch Aktivierung der *FT*-Expression diskutiert wird (Jarillo and Pineiro, 2011; Srikanth and Schmid, 2011). In Anwesenheit von GA wird die GA-vermittelte Signalkette durch Degradierung der DELLA-Proteine, transkriptionelle Regulatoren der *GRAS*-Genfamilie, gewährleistet (Jarillo and Pineiro, 2011; Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009). In kurzen Photoperioden akkumuliert GA im Apex und aktiviert die Expression der Gene *LFY* und *SOC1*, die wiederum Identitätsgene zur Bildung von Blütenmeristemen und Blütenorganen aktivieren (Srikanth and Schmid, 2011; Irish, 2010; Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009; Eriksson *et al.*, 2006). Ebenso konnte gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Aktivierung von *SOC1* und *LFY*, GA einen negativen Einfluss auf den floralen Repressor *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) ausübt (Srikanth and Schmid, 2011).

Mutanten des autonomen Stoffwechselwegs sind im Gegensatz zu Mutanten der tageslängenabhängigen Signalkette, sowohl unter Kurztag-, als auch unter Langtagbedingungen spätblühend. Der autonome Stoffwechselweg agiert unabhängig von dem tageslängenabhängigen und dem hormonabhängigen Stoffwechselweg, und fördert die Blühinduktion durch Reprimierung des MADS-Box Transkriptionsfaktor FLOWERING LOCUS C (FLC) über Faktoren zur Chromatinmodifikation (Amasino, 2010; Srikanth and Schmid, 2011). FLC interagiert mit dem MADS-Box Transkriptionsfaktor SVP und verhindert die Expression der „*floral integrator genes*“ *FT*, *SOC1* und *FD* durch direkte Bindung des Repressorkomplexes an *cis*-regulatorische Promotorbereiche (Searle *et al.*, 2006; Michaels, 2009; Jarillo and Pineiro, 2011). Die Aktivität von *FLC* wird neben den Genen des autonomen Stoffwechselwegs, zusätzlich durch Gene des vernalisationsabhängigen Stoffwechselwegs reguliert. Dieser wird durch eine längere Wachstumsphase der Pflanzen unter kalten Temperaturen aktiviert, ein Vorgang der als Vernalisation bezeichnet wird, und fördert die Blühinduktion ebenfalls durch Reprimierung von *FLC* (Amasino, 2010; Yan *et al.*, 2010). Hierbei wird die *FLC* Expression durch repressive Histonmodifikationen während des Wachstums in kalten Temperaturen, sowie langanhaltend, auch nach Anstieg der Temperaturen, aktiv unterdrückt (Jarillo and Pineiro, 2011; Amasino; 2010; He, 2009).

Neben den beiden reprimierenden Stoffwechselwegen wird die Aktivität von *FLC* positiv durch den dominanten Blühzeitpunktregulator *FRIGIDA* (*FRI*) reguliert. *FRIGIDA* kodiert für ein Protein mit zwei potentiellen Coiled-Coil-Motiven zur möglichen Protein- oder Nukleinsäure-Interaktion (Geraldo *et al.*, 2009). Studien haben gezeigt, dass *FRIGIDA* mit vier weiteren Proteinen den sogenannten *FRI-C* Komplex bildet (Choi *et al.*, 2011). Dieser Proteinkomplex reguliert während der vegetativen Entwicklung positiv die *FLC* Expression und hat die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren und Komponenten zur Chromatinmodifikation im proximalen Bereich des *FLC* Promotors zur Folge (Choi *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2010; Jarillo and Pineiro, 2011).

Zwei erst kürzlich beschriebene Stoffwechselwege zur Blühinduktion sind zum einen abhängig von der Umgebungstemperatur (*ambient temperature pathway*) und zum anderen vom altersbedingten Entwicklungszustand der Pflanze (*aging pathway*). Die Gene des Umgebungstemperatur-abhängigen Stoffwechselwegs fördern eine schnellere Blühinduktion bei Wachstum der Pflanzen unter höheren Temperaturen als unter niedrigeren Temperaturen (Blázquez *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass

SVP in dieser Signaltransduktionskette eine wichtige Funktion einnimmt, da *syp* Mutanten nicht auf die Umgebungstemperatur reagieren und einen frühblühenden Phänotyp sowohl bei Wachstum unter 16°C, als auch bei 23°C zeigen (Lee *et al.*, 2008; Srikanth and Schmid, 2011).

Der altersabhängige Stoffwechselweg reguliert neben der Blühinduktion während der gesamten pflanzlichen Entwicklung die Übergänge der einzelnen Wachstumsphasen in Abhängigkeit von Tageslänge und Temperatur, durch genetische Interaktion der *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* Gene und der microRNAs, miR156 und miR172 (Zhu and Helliwell, 2011; Huijser and Schmid, 2011). Dabei wirkt die miR156 negativ auf verschiedene Gene der *SPL*-Familie, die in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums durch Aktivierung der miR172, sowie *LFY*, *SOC1*, *FUL* und *API* die Blühinduktion vermitteln (Zhu und Helliwell, 2011; Huijser and Schmid, 2011).

1.6. Zielsetzung

Um mehr über die genetischen Mechanismen der Initiation axillärer Meristeme zu erfahren, sollten im Rahmen dieser Arbeit neue, redundant wirkende Verzweigungsregulatoren mittels natürlich vorkommender Variation in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Hierzu wurde ein „*second-site modifier screen*“ angewendet, in dem die *las* Mutante zu sechs verschiedenen *Arabidopsis* Ökotypen gekreuzt, und die Nachkommenschaften auf Verstärker und Revertanten des beschriebenen *las* Verzweigungsdefekts charakterisiert wurden. Der identifizierte, verstärkte *las* Phänotyp wurde unter Verwendung des *SNPtile1* Array und durch Etablierung von Rückkreuzungspopulationen kartiert. Doppel- und Dreifachmutanten der *las* Mutante mit möglichen Kandidaten sollten phänotypisch charakterisiert und deren Einfluss auf die Initiation von Lateralmeristemen, insbesondere während der reproduktiven Entwicklung der Pflanze, näher untersucht werden. Hierzu sollte die Expression bekannter Verzweigungsregulatoren im Hintergrund verschiedener Mutanten mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung und quantitativer Real-Time-PCR, während der pflanzlichen Entwicklung überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt

Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Difco Laboratories GmbH, Augsburg

Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Merck KGaA, Feinchemikalien und Laborbedarf, Darmstadt

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.1.2. Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Alle Puffer, Lösungen und Kulturmedien wurden, falls nicht anders angegeben, nach Sambrook und Russel (2001) hergestellt und mit steril-gefiltertem Milli-Q Reinstwasser (Merck Millipore GmbH, Darmstadt) angesetzt. Zur Sterilisation wurden Kulturmedien und konzentrierte Stocklösungen 20min bei 121°C autoklaviert.

2.1.3. Verbrauchsmaterial

Objektträger (Superfrost Plus)

Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig

Deckgläser

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Kits zur Nukleinsäurebehandlung

QIAGEN GmbH, Hilden

Filterspitzen (Neptune, BarrierTips)

LTF Labortechnik GmbH & Co. KG,
Wassenburg/ Bodensee

2.1.4. Enzyme

Im Folgenden sind die Bezugsquellen der verwendeten Enzyme aufgeführt:

Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

New England BioLabs GmbH, Schwalbach/ Taunus

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.5. Antikörper

Folgender Antikörper wurde für RNA-*in-situ*-Hybridisierungen verwendet:

Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragments (aus Schaf), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.6. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, und Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe, bezogen und mit steril-filtriertem TE-Puffer auf eine Stockkonzentration von 100µM angesetzt.

Verwendete Cleaved-Amplified-Polymorphic-Sequence (CAPS)-Marker auf Chromosom IV zur Kartierung rekombinanter Pflanzen der Ökotypen Columbia und C24:

Marker	Sequenz 5' → 3'	Poly-morphismus; Pos.Chr. IV (bp)	Enzym	Produkte in bp
AT4G00290-F1	ATGATCTTCACCGCCTCAAG	SNP, 123.279	BceAI	Col: 411 C24: 267, 144
AT4G00290-R1	CAGTGGCGAGCAATAGCAT			
AT4G00330-F1	TCAAATCACAACCATTACACATGA	SNP, 143.127	TaqI	Col: 119, 50, 27 C24: 146, 50
AT4G00330-R1	TCAACTCACAGAGAAAAGTGACG			
IV-188581-F	TCTGGACGGTAAACAAAAATCG	Deletion, 188.754	-----	Col: 341 C24: 290
IV-188925-R	CAAGTGGCTGGTTGATAGAATG			
AT4G00480-F1	CCATTGTGAAGGAGAGAAGACA	SNP, 219.312	TseI	Col: 283 C24: 189, 94
AT4G00480-R1	GGAGTGGGAGAAAGGATGTT			
AT5G00590-F1	TCGACCATTCTTCGTCAGGT	SNP, 253.113	BseRI	Col: 279 C24: 141, 138
AT4G00590-R1	CATTTGTGCTCGGGTCATC			
IV-260516-F	TCCAGGGAAGAACAGTCTAATTG	SNP, 260.665	BtsI	Col: 155, 107 C24: 262
IV-260779-R	TGATGTTTACCGATTGCTCCT			
IV-267627-F	CTGAGCGAACTTTAGAATCAATCA	SNP, 267.761	MspI	Col: 278 C24: 144, 134
IV-267904-R	ACTCGATTCTCACTCACTCTCG			

fri-F-900	AATGAGATTGCCGGTGCTT	Deletion, 268.716	-----	Col: 99 C24: 115
fri-R-1015	TGTCAACAAAAGGAACCACCT			
IV-273742-F	TCCATAATCTCGGTGCGATA	SNP, 273.886	BsrI	Col: 142, 130 C24: 272
IV-274013-R	GCTCAAGATTAACGCTATGCAA			
IV-279253-F	CATGTTTCGATTACAAAAGGTGAA	SNP, 279.423	BsiHK AI	Col: 174, 139 C24: 313
IV-279565-R	TGGGGACTTGGTATGGAATG			
IV-281469-F	AAAAAGAAAGCAGCAAGGTGTT	SNP, 281.565	BccI	Col: 100, 91 C24: 191
IV-281659-R	TGCATCCACAAACATTGATACA			
IV-283501-F	TGAATCTCCATTTTGGCTTGA	SNP, 283.724	HpyCH 4IV	Col: 222, 145, 12 C24: 379
IV-283880-R	TTCATGCTGACGTGGATCA			
IV-300890-F	GTCAACATTTCCAACAGTGAGC	SNP, 301.021	TseI	Col: 191, 125 C24: 316
IV-301209-R	CTTGTTTTGGCTCTCAAAGAT			
IV-331313-F	CAAAGAGGAAACAATCCAATGC	SNP, 331.479	TaqI	Col: 164, 109 C24: 273
IV-331585-R	ATCCTGTGGTTGTTGTCGTGT			
IV-397959-F	GAAGAGAAAGCGAACGAAGG	SNP, 398.078	HphI	Col: 131, 126 C24: 257
IV-398215-R	CAAATTCCTGAAACATAATTGTAG			
IV-605722-F	TGCCACTATCGTATAATTTTTGTTAG A	SNP, 605.948	MseI	Col: 226, 165, 134, 62, 38 C24: 391, 134, 62, 38
IV-606347-R	GTGTGGTGTGTTTTCGTTGG			
IV-900082-F	ACCCTCCTGCCATTTTCTTT	MSAT, 900.093	-----	Col: 146 C24: 169
IV-900228-R	ACCCTTTTTGTTTCGTTGTCTC			

Molekulare Marker zur Identifikation mutanter Allele verschiedener Linien:

Locus	Allel	Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'
AT1G55580	<i>las-4</i>	AtLs2349F	ACCTCCGTCGTCTTCTTTTC
		AtLs2593muR	TGGTTCGAAACAAGAAGTAGT
		AtLs2599F	CAGTGTATGCAAAGAACAGTTC
		AtLs3070R	AACACAATTGACGGCAATGG
AT5G23000	<i>rax1-3</i>	Myb37-4881F	TGGTTTCTTGCTCAACCACA
		M37-1896R	GAAATGATCTACTCTTCTCGACC
		SALK-LB1	TCGGAACCACCATCAAAC
AT4G00650	<i>FRI</i> in Col aus SF-2	fri-F-900	AATGAGATTGCCGGTGCTT
		fri-R-1015	TGTCAACAAAAGGAACCACCT
		Col = 99bp; C24, Kyo, SF-2 = 115bp	
AT5G15840	<i>co-sail</i>	co-158-F	TTGCTTCCC GCCATAAAC
		co-R-1030	GGCACAACACCAGTTTCCAT
		co-SAIL-R2	CCAAACAACGCTTTACAGCA
AT5G61850	<i>lfy-14</i>	lfy-F-1166	AGGGAGCATCCGTTTATCGT; (dCAPS, SspI)
		lfy-R-1254	CCTGAAGAAGGAACTCACGGCAAT; (dCAPS; SspI)

Zur *FRIGIDA* Sequenzierung verwendete Oligonukleotide:

Oligonukleotid	Sequenz 5'→ 3'	Bereich / Produkt in bp
fri-F--589	CTGAAGATCATCGAATTGGC	Promotordeletion (-376bp); Col: 829 Ler: 453
fri-R-240	TCTGAACAGCGACGAAGAGA	
fri-F-72	TCTGAACAGCGACGAAGAGA	G146E => BamHI Verdau: Col: 631 Ler: 377 + 254
fri-R-703	CCTCCCTTTACCACGATCA	
fri-F-547	AGGAGCCAGCGAAGTTTGT	16bp Deletion; Col: 740 Ler: 756
fri-R-1303	CACTTCTTAGAGTTGGCATTGCT	
fri-F-1160	CGAAATTGTTGCTTGTCAGAA	Col = Ler: 830
fri-R-1990	TGAGCGATGAGGAAAAGATG	
fri-F-1842	CATGGAAATGCCACCAGTAA	Col = Ler: 856
fri-R-2698	TCAAGTTGGATCTTCGGTGA	

Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung von *RAX1* RNA-*in-situ*-Sonden:

Verwendung	Oligonukleotid	Sequenz 5'→ 3'
RAX1 PCR-Produkt	M37-1987F	CAATCCCATCTTCTTCTTACAATCC
	M37-2489-R	GCTACCACTGCTTTTGTTC
RAX1- Gegensinn	M37-1987F	CAATCCCATCTTCTTCTTACAATCC
	M37-2489-T7R	TAATACGACTCACTATAGGGGCTACCACTGCTTTTGTTC
RAX1- Sinn	M37-1987-T7F	TAATACGACTCACTATAGGGCAATCCCATCTTCTTCTTACAA TCC
	M37-2489R	GCTACCACTGCTTTTGTTC

Verwendete Oligonukleotide für quantitative Real-Time (qRT)-PCR Experimente wurden mit H₂O (Milli-Q) auf eine Arbeitskonzentration von 2,5µM verdünnt:

Locus	Gen	Oligonukleotid	Sequenz 5'→ 3'	Referenz
AT1G73590	PP2A	PP2A_F	TAACGTGGCCAAAATGATGC	Czechowski <i>et al.</i> , 2005
		PP2A_R	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	
At1G55580	LAS	AtLs3233F	ATGGCGATCTTTGATTCGTT	-----
		AtLs3297R	CCACCGTTGCTCTAGGGTTA	
AT5G23000	RAX1	RAX1-F-1154	GAACCACACCAGTTTTTCTTCAG	-----
		RAX1-R-1263	CCTCTGGTCAATGTGGTGGT	

2.1.7. Pflanzen

Für alle Analysen wurden Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* Heynh. vom Ökotyp Columbia und C24 verwendet. Für Experimente mit der *las*-Mutante wurde das *las-4* Allel im Ökotyp Columbia gewählt, welches eine Deletion von 20bp bei bp 365 im offenen Leseraster aufweist (Greb *et al.*, 2003) und fortan als *las* bezeichnet wird. Samenmaterial wurde von Rick Amasino, George Coupland, Peter Huijser und Maarten Koornneef zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden Samen vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bezogen.

Linie	Allel	Variation	Öko- typ	Quelle
<i>lateral suppressor</i>	<i>las-4</i>	Deletion	Col-0	Greb <i>et al.</i> , 2003
<i>regulator of axillary meristems 1</i>	<i>rax1-3</i>	T-DNA Insertion	Col-0	SALK_071748
<i>FRIGIDA</i>	<i>FRI</i>	FRI Introgression aus SF-2 in Col-0	Col-0/ SF-2	R. Amasino; Michaels and Amasino, 1999
<i>constans</i>	<i>co-SAIL</i>	T-DNA Insertion	Col-0	G. Coupland; Laubinger <i>et al.</i> , 2006
<i>leafy</i>	<i>lfy-14</i>	EMS	Col-0	NASC: N6282

Ökotyp	Abkürzung	Ursprung	Quelle
C24	C24	Portugal	Huang <i>et al.</i> , 2011
Shahdara	Sha	Tadjikistan	Huang <i>et al.</i> , 2011
Eringsboda	Eri-1	Schweden	Huang <i>et al.</i> , 2011
Antwerpen	An-1	Belgien	Huang <i>et al.</i> , 2011
Kyoto	Kyo-1	Japan	Huang <i>et al.</i> , 2011
Cvi	Cvi	Kapverden	Huang <i>et al.</i> , 2011

2.1.8. Software und Datenbanken

Zur *in-silico* Analyse von DNA-Sequenzen, Sequenzierungsergebnissen, Erstellung sequenzspezifischer Oligonukleotide und molekularer Marker, sowie enzymatischer Restriktionsverdauung wurde die DNASTAR Lasergene[®] Software benutzt.

Für Informationen über *Arabidopsis* Gene und Allel-Varianten wurde die Datenbank *TAIR* (The Arabidopsis Information Resource; <http://www.arabidopsis.org>) verwendet.

Die Datenbank *T-DNA Express* (Alonso *et al.*, 2003; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) wurde für Informationen über T-DNA Insertionen genutzt.

Für BLAST Analysen und zum Download von Gen-Sequenzen wurde die Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hinzugezogen.

Für die Erstellung sequenzspezifischer Oligonukleotide wurde das Online-Programm *Primer3* (Rozen and Skaletsky, 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) benutzt.

Die Erstellung von dCAPS-Markern erfolgte mit Hilfe des Online-Programms *dCAPS Finder 2.0* (Neff *et al.*, 2002; <http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>).

Informationen über Polymorphismen zur Unterscheidung der Ökotypen Columbia und C24 wurden über das Online-Programm *SBE* („SNPs between accessions“) der Datenbank *Polymorph* (Clark *et al.*, 2007; Zeller *et al.*, 2008; <http://polymorph-clark20.weigelworld.org>) bezogen.

Für allgemeine Informationen über *Arabidopsis* Ökotypen wurde die Datenbank *VNAT* (Study of the Natural Variation of *Arabidopsis thaliana*; <http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat/>) des *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA, Frankreich) verwendet.

2.2. Methoden

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

2.2.1. Isolierung genomischer DNA

Für alle zugehörigen Experimente erfolgte die Isolierung genomischer Pflanzen-DNA mittels des *BioSprint 96 DNA Plant Kit* (Qiagen) unter Verwendung der *BioSprint 96 workstation* (Qiagen).

2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion diente der sequenzspezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Kartierung, Genotypisierung und Sequenzierung. Für einen 40µl Reaktionsansatz wurde folgendes Standardprotokoll verwendet:

	Stock	Vol. in µl/ Reaktion	Endkonzentration/ Reaktion
DNA	20-50ng/µl	2,0	40-100ng
PCR-Puffer	10x	4,0	1x
MgCl ₂	50mM	2,4	3mM
dNTP Mix	25mM	0,4	0,25mM
Forward Primer	100µM	0,16	0,4µM
Reverse Primer	100µM	0,16	0,4µM
<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase (<i>Taq</i>)		0,16	~1-2U
H ₂ O (Milli-Q)		30,72	

Der 10x PCR-Puffer wurde nach Sambrook und Russel (2001), die eingesetzte *Taq*-Polymerase nach Pluthero (1993) hergestellt. Bei Reaktionen mit mehr als zwei Oligonukleotiden wurde entsprechend weniger H₂O (Milli-Q) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte entweder unter Verwendung eines *Mastercycler® egradient* (Eppendorf, Hamburg) oder eines *SensoQuest Labcycler Gradient* (SensoQuest Biomedizinische Elektronik GmbH, Göttingen) nach folgendem Programm:

Denaturierung	94°C	3min		
Denaturierung	94°C	15sec	}	33 Zyklen
Annealing	59°C	15sec		
Elongation	72°C	60sec/ kb		
Elongation	72°C	5min		

2.2.3. Aufreinigung von PCR Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen).

2.2.4. Restriktionsverdau von PCR-Produkten

Mit dCAPS- und CAPS-Markern amplifizierte PCR-Produkte zur Genotypisierung und Kartierung wurden gemäß Herstellerangaben 1h bei Optimaltemperatur inkubiert und anschließend, wenn möglich, Hitze inaktiviert. Für den enzymatischen Restriktionsverdau wurden 10µl des PCR-Produkts mit 10µl Mastermix, bestehend aus 2,5U Enzym, 2µl entsprechendem Restriktionspuffer und Zugabe von H₂O (Milli-Q) auf ein Endvolumen von 20µl, versetzt.

2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Größentrennung amplifizierter PCR-Produkte und erfolgte standardmäßig auf 2% Agarosegelen bei 110V und anschließender Färbung in EtBr-TAE-Pufferbad.

2.2.6. Genetische Kartierung

Alle für die Kartierung verwendeten Pflanzen wurden vorab auf Homozygotie des mutanten *las-4* Allels getestet.

2.2.6.1. Grobkartierung

Als Ausgangsmaterial dienten 350 Pflanzen einer BC1F2 Population die sechs Wochen in Kurztag- und anschließenden Langtagbedingungen bis zur Samenreife angezogen und

phänotypisch charakterisiert wurden. Drei Wochen nach der Keimung wurde von allen Pflanzen junges Blattmaterial geerntet und die extrahierte, genomische DNA mit Hilfe eines *TBS-380 Mini-Fluorometer* (Turner Biosystems) quantifiziert. Für die Durchführung einer „Bulk-Segregant Analysis“ (BSA) wurden zwei DNA Bulks hergestellt, bestehend aus einer äquimolaren Mischung genomischer DNA von jeweils 60 Pflanzen. Für den Wildtyp-Bulk wurde ausschließlich DNA von Pflanzen mit einem Index > 75% verwendet und für den Mutanten-Bulk ausschließlich DNA von Pflanzen mit einem Index geringer als 25% (siehe Kapitel Methoden: „Phänotypische Charakterisierung der Seitentriebbildung“).

Die Grobkartierung wurde von der MPIPZ Service-Einheit *Max Planck Genome Centre* unter Verwendung des *AtSNPtile1 Array* (Affymetrix) mittels eines *Affymetrix GeneChip 3000 7G Microarray System* durchgeführt. Die Markierung von 200ng genomischer DNA, sowie die anschließende Hybridisierung des *AtSNPtile1* erfolgten nach Zhang und Borevitz (2009).

Der *AtSNPtile1 Array* ist ein *tiling Array* bestehend aus einem *tiling probe set* und einem *SNP probe set* (Zhang and Borevitz, 2009). Das *tiling probe set* enthält 1,4Mio. spezifische 25bp Oligomer-Sequenzen (*tiling probes*) die mit einer 35bp Auflösung auf beiden DNA-Strängen das gesamte *Arabidopsis thaliana* Genom abdecken. Das *SNP probe set* des Array enthält 250.000 *SNP probes* deren Information aus der Resequenzierung 20 verschiedener Ökotypen gewonnen wurden (Clark *et al.*, 2007). Jeder SNP wird durch vier Sonden vertreten, für zwei Allele auf beiden DNA-Strängen, die sich nur durch das zentrale Nukleotid an Base 13 der 25bp Oligonukleotide unterscheiden. So ergeben sich für jeden SNP folgende Sonden: eine Sinn- und eine Gegensinn-Sonde für Allel 1, sowie eine Sinn- und eine Gegensinn-Sonde für Allel 2 (Zhang and Borevitz, 2009; Atwell *et al.*, 2010). Zur Qualitätskontrolle wurden für jeden Bulk zwei Arrays hybridisiert.

Die gesamte Daten-Analyse des *AtSNPtile1 Array* wurde von Dr. Fei He (Universität Münster, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Juliette de Meaux) durchgeführt. Bei der Auswertung des *AtSNPtile1 Array* wurde die Signalintensität gegen den Hintergrund korrigiert, sowie normalisiert (Borevitz *et al.*, 2003; Zhang and Borevitz, 2009). Da für die Kartierung nur Kreuzungsnachkommen der Ökotypen Columbia und C24 verwendet wurden, wurden in der Analyse nur polymorphe SNP zwischen Col-0 und C24 betrachtet. Für das Array-Design wurde als Referenzgenom der Ökotyp Col-0 gewählt basierend auf den verfügbaren Genomdaten der Datenbank TAIR (Version TAIR9; Zhang and Borevitz

2009). Als Referenz-Arrays dienten SNP Informationen des Magnus Nordborg Labors (<http://walnut.usc.edu/>; Atwell *et al.*, 2010). Für jede Array Hybridisierung wurden zwei *SNP probe ratios* (SPR) je Sonden Set berechnet. Hierfür wurde das zur Basis 2 logarithmierte (\log_2) Verhältnis der Signalintensitäten der Sinn-Sonde des Allels 1 zur Sinn-Sonde des Allels 2, sowie der Gegensinn-Sonde des Allels 1 zur Gegensinn-Sonde des Allels 2 berechnet. Zur Identifikation polymorpher SNP zwischen Col-0 und C24, wurden SNP Sonden Sets ausgewählt, bei denen jede Col-0 und C24 DNA vorzugsweise mit alternierenden, allelischen Sonden hybridisierte. Hierfür musste jedes Sonden Set folgende Voraussetzungen erfüllen: $SPR_{Col-0} > SPR_{C24}$, wobei Col-0 vorzugsweise mit Allel 1 hybridisiert und C24 vorzugsweise mit Allel 2. Unterschiede wurden in einem *ranked* t-Test mit dem Programm SAM berechnet, bei dem die Heterogenität der Signalvarianzen korrigiert wird (Tusher *et al.*, 2001). Für Prognosen über informative SNP wurde der FDR-Wert (*false discovery rate*) durch Permutation auf 0,05 gesetzt (Tusher *et al.*, 2001). Alle statistischen Analysen wurden mit R 2.10 (R Development Core Team 2010) durchgeführt.

2.2.6.2. Feinkartierung

Zur Feinkartierung rekombinanter Pflanzen der Ökotypen Columbia und C24 dienten BC3F2 und BC3F3 Populationen, die überwiegend mit CAPS-Marker untersucht wurden (siehe Kapitel Material: „Oligonukleotide“). PCR-Amplifikate mit einer Größe kleiner 300bp wurden auf 4% Agarosegelen, bestehend aus *UNIVERSAL AGAROSE* (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld) und *UltraPure™ LMP Agarose* (Invitrogen) im Verhältnis 1:1, unter direkter Zugabe von 10µl EtBr (1%ige Lösung; Merck KgaA) je 100ml TAE-Puffer, aufgetrennt.

2.2.7. Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der MPIPZ Service-Einheit *Automatische DNA Isolierung und Sequenzierung* (ADIS) unter Verwendung eines *Applied Biosystems 3730XL Genetic Analyzer* (Darmstadt) mittels *BigDye-terminator chemistry* durchgeführt. PCR-Produkte wurden vorab mit *ExoSAP-IT®* (USB Corporation, Cleveland; USA) gemäß Herstellerangaben behandelt.

2.2.8. Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

2.2.8.1. Pflanzenmaterial

Für qRT-Experimente wurden Pflanzen zwischen 12:00Uhr und 14:30Uhr (Mitteleuropäische Zeit, MEZ), nach 28 Tagen unter Kurztagbedingungen, sowie nach 28 Tagen unter kurzen und zusätzlich 7 Tagen unter langen Photoperioden, in Flüssigstickstoff geerntet. Mit einer Rasierklinge wurden Wurzel, sowie Blätter an der Basis entfernt und je Probe 5-10 Pflanzen verwendet. Je Linie wurden 3 biologische Replikate geerntet. Bis zur RNA-Extraktion wurde geerntetes Pflanzenmaterial bei -80°C gelagert.

2.2.8.2 Isolierung, Präzipitation und Aufreinigung von RNA aus Pflanzen

Die Extraktion pflanzlicher RNA erfolgte mittels des *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) gemäß Herstellerprotokoll. Die isolierte RNA wurde durch zweimalige Zentrifugation in insgesamt 80µl RNase-freiem H₂O (Qiagen) eluiert und anschließend 1h bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert. Für den DNase-Verdau wurden 70µl des Überstands mit 10U *recombinant DNase I* (Roche), 40U *Protector RNase Inhibitor* (Roche) und 1x Restriktionspuffer in einem Endvolumen von 80µl 2h bei 37°C verdaut. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 2vol absolut EtOH eiskalt und 1/10vol 5M NaAc (pH 5,2), sowie Inkubation über Nacht bei -20°C. Anschließend wurden die RNA-Proben 1h bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert und die gebildeten Pellets 2x mit EtOH absolut gewaschen, mit jeweils 15min Zentrifugation bei 4°C und 14.000rpm. Die Pellets wurden 2-5min mit geöffnetem Deckel bei Raumtemperatur getrocknet und in 32µl RNase-freiem H₂O (Qiagen) resuspendiert. Die Lagerung aller RNA-Proben erfolgte bei -80°C.

2.2.8.3. Quantifizierung von RNA

Die Konzentrationen der gereinigten RNA-Proben wurden mit einem *NanoDrop ND-1000 Spectralphotometer* (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) ermittelt.

2.2.8.4. cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte aus 1µg Gesamt-RNA mittels *Superscript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben unter Zugabe von 40U *Protector*

RNase Inhibitor (Roche). Für weitere Experimente wurde die cDNA mit H₂O (Milli-Q) 1:2 verdünnt.

2.2.8.5. qRT-Experiment

Quantitative Real-Time-Experimente wurden mit dem *LightCycler*[®] 480 *Real-Time PCR System* (Roche) unter Verwendung von *Power SYBR*[®] *Green (2x)PCR Master Mix* (Applied Biosystems) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

(2x) PCR Master Mix	7,5µl
Primer 1 (2,5 µM)	1,25µl
Primer 2 (2,5 µM)	<u>1,25µl</u>
	10,0µl
cDNA (1:2)	<u>5,0µl</u>
Endvol./ Reaktion	15,0µl

Je Probe wurden 3 technische Replikate mitgeführt.

2.2.8.6. Daten-Auswertung

Zur Auswertung der erhobenen Daten wurde die *standard curve method* (Applied Biosystems, User Bulletin #2, 2001) benutzt. Die Normalisierung erfolgte mit simultan generierten Expressionsdaten des Gens *PP2A* (Czechowski *et al.*, 2005).

2.2.9. RNA-*in-situ*-Hybridisierung

2.2.9.1. RNA-*in-situ*-Sonden

Als Vorlage der *RAX1* RNA-*in-situ*-Sonden diente das PCR-Amplifikat der Oligonukleotide M37–1987F und M37–2489-R, wie bereits beschrieben (Müller *et al.*, 2006). Die Synthese der Sonden erfolgte unter Verwendung der T7 RNA Polymerase (Roche) und des 10x DIG RNA Labeling Mix (Roche) gemäß Herstellerprotokoll. Die Sonden sind spezifisch für einen Bereich im dritten Exon und umfassen die bp 935-1437 der genomischen Sequenz relativ zum ATG-Startcodon.

2.2.9.2. Vorbereitung und Durchführung der RNA-*in-situ*-Hybridisierung

Die RNA-*in-situ*-Hybridisierung wurde mit kleinen Modifikationen nach Coen *et al.* (1990) durchgeführt. Zur Fixierung der Sprossapices wurden Wurzel und Blätter an der

Basis entfernt und direkt in Fixierungspuffer mit 0,03% Tween 20 überführt. Die Dehydrierung des Pflanzenmaterials erfolgte ohne Zugabe von NaCl, durch jeweils einstündige Inkubation in 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% und 80% EtOH, sowie Färbung in Eosin Y (1% in EtOH absolut) bei 4°C über Nacht. Die Einbettung der Proben in *Paraplast® Plus* (Tissue Embedding Medium; Leica Microsystems) erfolgte mit Hilfe des Einbettungsautomaten ASP300 (Leica Microsystems).

Auf die Hydrolyse der Sonden wurde verzichtet. Die Hybridisierung wurde bei 50°C über Nacht durchgeführt. Als Substrate für die enzymatische Farbreaktion dienten BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; Roche) und NBT (4-Nitro-blue-tetrazolium-chloride; Roche). Die Farbreaktion wurde durch jeweils ein-minütige Inkubation in H₂O (Milli-Q), 70% EtOH, 90% EtOH, 70% EtOH und H₂O gestoppt. Anschließend wurden die Proben unter 30% Glycerin mittels einfachen Durchlichts oder *Differential Interferenz Contrast* (DIC) unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

2.2.10. Wachstumsbedingungen für Pflanzen

Zur Synchronisation der Keimung wurden *Arabidopsis* Samen 2-3 Tage auf feuchtem Filterpapier bei 4°C stratifiziert und anschließend auf Erde ausgelegt. Langtagexperimente erfolgten im Gewächshaus bei einer relativen Luftfeuchte von ungefähr 50%, einer Tagestemperatur von ca. 20°C und einer Nachttemperatur von ca. 18°C, sowie einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16h Licht und 8h Dunkelheit. Kurztagexperimente wurden in einer *Percival* Wachstumskammer durchgeführt (Percival Scientific, Inc., Perry, USA) mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 8h Licht und 16h Dunkelheit, bei einer Tagestemperatur von 22°C und einer Nachttemperatur von 16°C, sowie einer relativen Luftfeuchte von 70%. Die Zuführung von Rotlicht durch 25W Glühlampen (*matt E27*, 260V; Glühlampenwerk Philippsburg) erfolgte zusätzlich 15min vor Aktivierung und nach Abschaltung der Leuchtstoffröhren (*F25T8/TL741/ALTO*, Philipps). Für qRT-PCR-Analysen erfolgte die Anzucht der Pflanzen ausschließlich in der *Percival* Wachstumskammer, bei einer Tagestemperatur von 22°C und einer Nachttemperatur von 16°C, ohne Einsatz von Rotlicht. Die Pflanzen wurden 28 Tage in Kurztagbedingungen (8h Licht; 16h Dunkelheit) angezogen und anschließend für 7 Tage in Langtagbedingungen überführt (16h Licht; 8h Dunkelheit).

2.2.11. Kreuzung von *Arabidopsis* Pflanzen

Kreuzungen von Pflanzen erfolgten wechselseitig und wurden überwiegend morgens durchgeführt. Hierzu wurden an jungen Blütenständen die zwei bis drei ältesten, noch nicht geöffneten Blüten ausgewählt, und mit Hilfe einer Pinzette Sepalen, Petalen und Staubgefäße entfernt. Das Infloreszenzmeristem, sowie jüngere Blüten wurden ebenfalls entfernt. Durch Verwendung von Antheren mehrerer Blüten des Pollenspenders wurde das freigelegte Gynoezeum bestäubt. Zur Reduktion der Dormanz wurden die Kreuzungssamen nach der Ernte bis zu vier Wochen bei Raumtemperatur nachgelagert.

Bei Kreuzungen mutanter Pflanzen wurde die Nachkommenschaft in der F₂-Generation mittels molekularer Marker auf Homozygotie der mutanten Allele getestet.

2.2.12. Phänotypische Charakterisierung der Seitentriebbildung

Die phänotypische Charakterisierung von Blattachsen während des vegetativen Wachstums erfolgte nach dem Öffnen der ersten Blüten, um sicherzustellen dass die Knospenbildung bereits stattgefunden hat. Hierzu wurden Wurzel und Spross der entsprechenden Pflanzen entfernt und diese kopfüber mit dem Wurzelhals nach oben unter dem Binokular analysiert. Um jüngere Blattachsen einsehen zu können wurden die Rosettenblätter der Reihe nach, entsprechend der Phyllotaxis, entfernt und ausgewertet.

Die Auswertung von Blattachsen am Haupttrieb erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines Binokulars. Nach der Phänotypisierung der Stängelblätter wurde für jede Pflanze ein Verzweigungsindex berechnet. Der Index bezeichnet den prozentualen Anteil der gebildeten Knospen am Haupttrieb, berechnet aus der Anzahl der angelegten Knospen in Achseln von Stängelblättern im Verhältnis zur Anzahl der Stängelblätter. In Blattachsen gebildete Seitentriebe die in einzelnen Blüten oder Blättern terminierten wurden wie Knospen gezählt.

2.2.13. Analyse des Blühzeitpunkts

Die Analyse des Blühzeitpunkts erfolgte entweder durch Ermittlung der Tage bis zur Blüte nach der Keimung (DTF), wenn sich die erste Blüte vollständig geöffnet hatte, oder durch Zählen der Rosettenblätter bis zur Blüte (RLN). Neu gebildete Blätter wurden alle fünf bis sechs Tage gezählt und mit einem Farbstift markiert.

3. Ergebnisse

3.1. „*Second-Site Modifier Screen*“ zur Identifikation neuer Verzweigungsregulatoren

Die Anlage von Lateralmeristemen wird im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung durch die Aktivität redundant wirkender Gene bestimmt (Müller *et al.*, 2006). Genetische Studien der *las* Mutante zeigten, dass der Funktionsverlust des LATERAL SUPPRESSOR (LAS) Proteins lediglich einen negativen Einfluss auf die Anlage von Lateralmeristemen während der vegetativen Phase der Entwicklung hat (Greb *et al.*, 2003). Phänotypische Charakterisierungen der Doppelmutanten *las-4 axr1-12* hingegen verdeutlichten, dass LAS auch einen Einfluss auf die Anlage von Achselmeristemen während der reproduktiven Entwicklung der Pflanze besitzt (Greb *et al.*, 2003). Der alleinige Verlust des LAS Proteins in *las* Mutanten zeigte jedoch keine Auswirkung auf die Seitentriebentwicklung nach der Blühinduktion (Greb *et al.*, 2003), so dass die Aktivität redundanter Gene vermutet wurde. Zur Identifikation solch redundant wirkender, noch unbekannter Verzweigungsregulatoren wurde ein „*second-site modifier screen*“ angewendet. Hierfür wurde die *las* Mutante im Ökotyp Columbia zu sechs genetisch verschiedenen Ökotypen gekreuzt und die Nachkommenschaft auf Verstärker (Enhancer) und Revertanten (Suppressor) des *las* Verzweigungsdefekts untersucht (Paulo *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011). Die Verwendung dieses genetisch sensibilisierten Hintergrunds der *las* Mutation bietet die Möglichkeit gezielt Gene aufzudecken, die eine Funktion in der Anlage von Achselmeristemen ausüben und deren mutante Phänotypen in einem genetischen Wildtyp Hintergrund durch Redundanz nicht zu erkennen wären.

3.1.1. Phänotypische Charakterisierung der *las* Kreuzungen zu verschiedenen *Arabidopsis* Ökotypen

Die *las* Mutante (Col-0) wurde mit den Ökotypen „C24“, „Kyoto“ (Kyo), Shahdara“ (Sha), „Antwerp“ (An-1), „Eriengsboda“ (Eri), und „Cape Verde Island“ (Cvi) gekreuzt (Abb. 3-1). Die Nachkommenschaften wurden auf das mutante *las-4* Allel getestet und nur *las-4* homozygote Pflanzen wurden für weitere Experimente verwendet. Die Pflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und dann in Langtagbedingungen

überführt. Für eine detailliertere Analyse und eine bessere Vergleichbarkeit der Einzelpflanzen zur Gesamtpopulation wurde für jede Pflanze ein Verzweigungsindex berechnet. Der Index bezeichnet den prozentualen Anteil der gebildeten Knospen am Haupttrieb, berechnet aus der Anzahl der angelegten Knospen in Achseln von Stängelblättern im Verhältnis zur Anzahl der Stängelblätter.



Abb. 3-1: Aufnahmen von Blattrosetten der verwendeten Ökotypen.

Aufnahmen von Blattrosetten der verwendeten Ökotypen (A) C24, (B) Kyo, (C) Sha, (D) An-1, (E) Eri und (F) Cvi. Die genetische Variabilität der verwendeten Wildtypen wird durch die unterschiedlichen Blattformen der einzelnen Ökotypen deutlich. Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen.

3.1.1.1. Phänotypische Charakterisierung der Seitentriebentwicklung verwendeter Ökotypen

Bei der phänotypischen Charakterisierung der Seitentriebentwicklung zeigte keiner der untersuchten Ökotypen einen Defekt in der Anlage von Lateralmeristemen, weder in Rosettenblattachseln während der vegetativen Entwicklungsphase, noch in Stängelblattachseln nach der Blühinduktion (Abb. 3-3). So bildeten Pflanzen, die sechs Wochen in kurzen und anschließend in langen Photoperioden wuchsen, in jeder Blattachsel ein Lateralmeristem. Ebenso konnte unter den verwendeten Anzuchtbedingungen, in keinem der Wildtypen eine vermehrte Anlage von Seitentrieben festgestellt werden. Auffällig war jedoch im Ökotyp Cvi die stark reduzierte Anzahl an Stängelblättern im Vergleich mit der *las* Mutante (Abb. 3-3 A). Eine erhöhte Anzahl an Blüten anstelle von Seitentrieben, war in Stängelblattachseln des Ökotyp Eriensboda sichtbar (Abb. 3-3 B), vergleichbar mit *las*

Mutanten der Kontrollpopulation. Pflanzen des Wildtyp Shahdara wiesen eine enorme Variabilität bei der Blattanzahl am Haupttrieb auf (Abb. 3-3 F).

Für weitere Analysen wurde der Ökotyp C24 vollständig in Langtagbedingungen angezogen (Abb. 3-2). C24-Pflanzen die sechs Wochen unter Kurztag- und anschließenden Langtagbedingungen angezogen wurden, bildeten in jeder Blattachsel eine Knospe (Abb. 3-3 D). Bei der phänotypischen Auswertung der in langen Photoperioden gewachsenen Pflanzen, konnte die Bildung akzessorischer Seitentriebe festgestellt werden (Abb. 3-2).

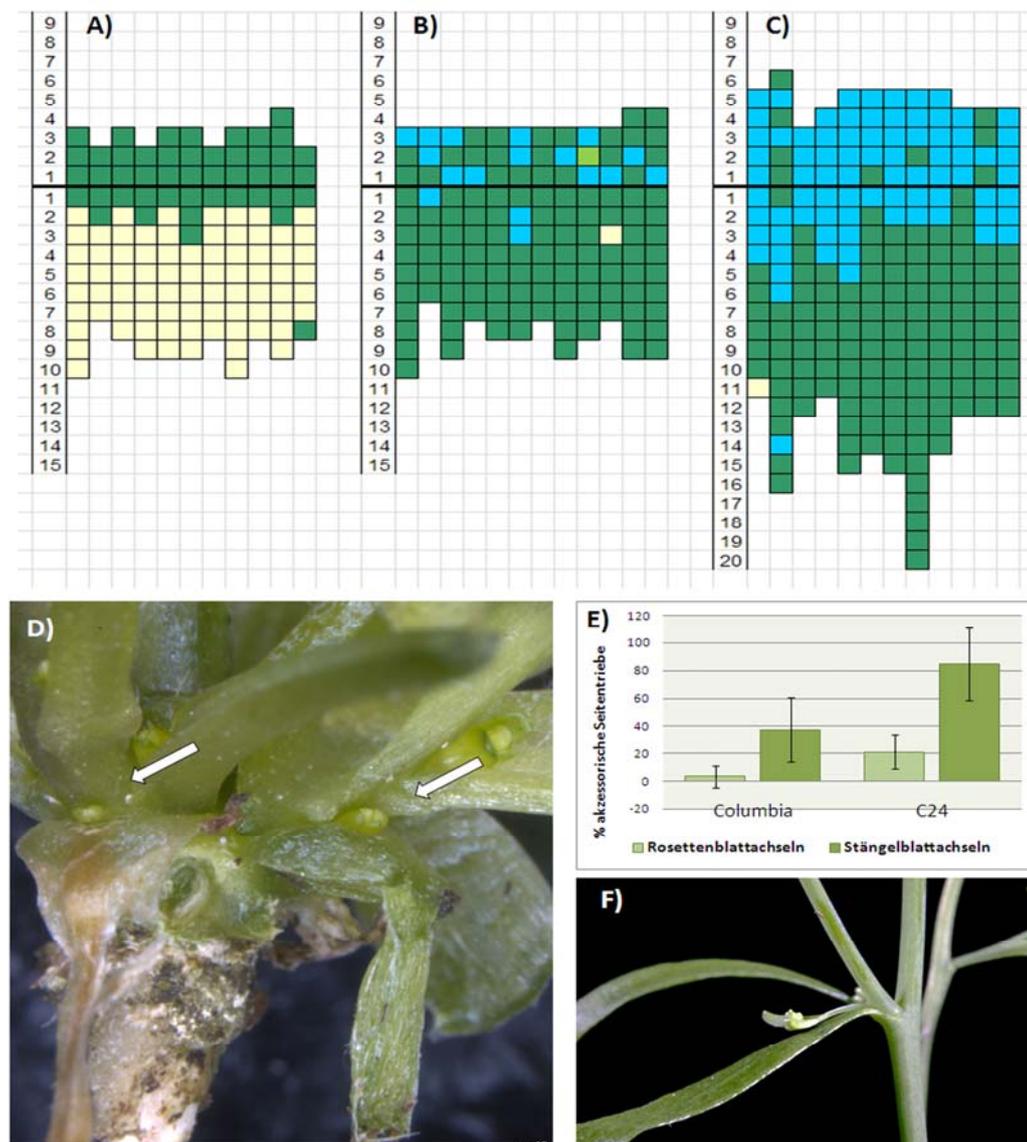


Abb. 3-2: Seitentriebbildung im Ökotyp C24 unter Langtagbedingungen.

Seitentriebbildung in (A) *las* Mutanten im Columbia Hintergrund, (B) Columbia Wildtyp und (C) C24 Wildtyp. (D) Großaufnahme von Rosettenblattachseln des Ökotyp C24. Pfeile deuten auf die Bildung akzessorischer Knospen. (E) Bildung akzessorischer Seitentriebe in Columbia und C24 in Rosetten- und Stängelblattachseln. Vertikale Fehlerindikatoren: Standardabweichung. (F) Bildung eines akzessorischen Seitentriebs in einer Stängelblattachsel von C24. **Grafik:** Jede Spalte repräsentiert eine Pflanze und jedes farbige Quadrat stellt eine Blattachsel dar. Die verdickte, horizontal verlaufende Linie stellt die Grenze

zwischen dem jüngsten Rosetten- und dem ältesten Stängelblatt dar, mit zunehmend älter werdenden Rosettenblättern darunter und zunehmend jünger werdenden Stängelblättern darüber. **Farben:** grün repräsentiert das Vorhandensein einer Knospe oder eines Seitentriebs, gelb repräsentiert das Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs, hellgrün repräsentiert das Vorhandensein eines Blattes anstelle eines Seitentriebs, blau repräsentiert eine akzessorische Knospe/ Seitentrieb.

Während der vegetativen Entwicklungsphase wurde in 21% der Rosettenblattachsen von C24-Pflanzen eine zusätzliche Knospe angelegt (Abb. 3-2 C, D, E). Dieser Anteil war in Pflanzen des Ökotyp Columbia stark reduziert. Hierbei konnte eine Bildung akzessorischer Knospen in nur ~4% der Rosettenblattachsen verzeichnet werden (Abb. 3-2 B, E). Nach der Blühinduktion wurden in C24 in 85% der Blattachsen akzessorische Seitentriebe angelegt (Abb. 3-2 C, E, F), wohingegen in Columbia der Anteil akzessorischer Triebe bei nur 38% lag (Abb. 3-2 B, E). Im Vergleich ließ die *las* Mutante im Columbia Hintergrund den beschriebenen Verzweigungsdefekt in Achseln der vegetativen Phase erkennen und nur die jüngsten 1-3 Rosettenblattachsen zeigten die Bildung von Lateralmeristemen (Abb. 3-2 A). Wie bereits durch Greb *et al.* (2003) beschrieben, ist die Anlage akzessorischer Seitentriebe in der *las* Mutante unterdrückt (Abb. 3-2 A).

3.1.1.2. Phänotypische Charakterisierung der *las* Kreuzungspopulationen

In fünf der sechs untersuchten F2-Populationen konnte eine Verstärkung des *las* Verzweigungsdefekt während der reproduktiven Phase der Entwicklung festgestellt werden (Abb. 3-3). Die *las/Cvi* Kreuzung zeigte als Einzige der untersuchten Populationen keine Abweichung vom Verzweigungsmuster der *las* Mutante, allerdings war die Anzahl der Stängelblätter in mehr als 50% der Pflanzen reduziert und vergleichbar mit dem Phänotyp des Elter *Cvi* (Abb. 3-3 A). Der schwächste Effekt konnte in der *las/Eri* Kreuzung beobachtet werden, wobei in nur einem Drittel der untersuchten Pflanzen ein geringer Defekt der Seitentriebbildung ermittelt werden konnte (Abb. 3-3 B).

In den übrigen vier Populationen *las/An-1*, *las/C24*, *las/Kyo* und *las/Sha*, ließ sich ein intermediärer Verzweigungsdefekt erkennen (Abb. 3-3 C-F). Hierbei folgte die Seitentriebbildung einem basipetalen Gradienten und die Anlage von Lateralmeristemen war hauptsächlich in älteren Stängelblattachsen mit einer größeren Distanz zum Sprossapikalmeristem unterdrückt.



Abb. 3-3: Seitentriebbildung in F2-Populationen aus Kreuzungen verschiedener Ökotypen mit der *las* Mutante.

F2-Population der Kreuzung: **(A)** *las*/Cvi (n=41) mit Kontrollpopulationen der *las* Mutante und des Ökotyp Cvi; **(B)** *las*/Eri (n=42) mit Kontrollpopulationen; **(C)** *las*/An-1 (n=52) mit Kontrollpopulationen; **(D)** *las*/C24 (n=39) mit Kontrollpopulationen; **(E)** *las*/Kyo (n=33) mit Kontrollpopulationen; **(F)** *las*/Sho (n=50) mit Kontrollpopulationen. Pflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und dann in Langtagbedingungen überführt. Die Populationen sind nach dem berechneten Verzweigungsindex sortiert, absteigend von links nach rechts. Da ausschließlich Pflanzen im *las* Hintergrund untersucht wurden, werden nur die 5 jüngsten Rosettenblattachseln dargestellt. **Farben:** grün = Knospe/ Seitentrieb; gelb = Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs; hellgrün = Blatt anstelle einer Knospe/ Seitentriebs; rosa = Blüte anstelle eines Seitentriebs.

Der sichtbarste Seitentriebdefekt in Kreuzungsnachkommen des Ökotyp Antwerpen zeigte sich in einer Pflanze mit einem berechneten Verzweigungsindex von 37,5%, entsprechend wurde in nur 37,5% der gebildeten Stängelblattachsen ein Lateralmeristem angelegt (Daten nicht gezeigt). In den Populationen mit C24, Kyoto und Shahdara ließ sich die größte Abweichung vom elterlichen *las*-Phänotyp erkennen (Abb. 3-3 D-F). So lag in 25% der Gesamtpopulation von *las*/Kyo und in 26,5% der Pflanzen aus *las*/Sha die Anlage axillärer Meristeme in Stängelblattachsen unter 37% (Daten nicht gezeigt). Nahezu 50% der beiden Gesamtpopulationen wiesen keine Abweichung auf. Die stärkste Differenz vom Verzweigungsmuster des *las* Elter konnte in der Population *las*/C24 festgestellt werden (Abb. 3-3 D). Hierbei lag die Seitentriebbildung in Blattachsen des Haupttriebs in 33% der Pflanzen unter 37% (Daten nicht gezeigt).

Die genetischen Grundlagen des intermediären Phänotyps konnten zu diesem Zeitpunkt noch nicht genau bestimmt werden. Es wurde angenommen, dass es sich um einen intermediären Erbgang mit unvollständiger Dominanz handelt, so dass die Ausprägung unterschiedlicher Allele eines Gens in einem Aufspaltungsverhältnis von 1:2:1 sichtbar wird. Unter dieser Annahme ergab sich exemplarisch für die F₂-Population der Kreuzung *las*/C24 folgende phänotypische Klassifizierung (Graphische Darstellung Abb. 3-3 D; prozentuale Daten nicht gezeigt):

- Ca. ein Viertel (23%) der untersuchten Pflanzen zeigten einen unveränderten *las*-Phänotyp und bildeten in jeder Stängelblattachsel eine Knospe.
- Ca. ein Viertel (23%) der Pflanzen zeigten einen starken Verzweigungsdefekt und reproduktive Seitentriebe wurden in maximal 25% der vorhandenen Stängelblattachsen angelegt.
- 54% der Population wiesen einen intermediären Phänotyp mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad auf.

Bei einem dominant-rezessiven Erbgang beträgt die genotypische Aufspaltung ebenfalls 1:2:1, die phänotypische Aufspaltung hingegen 3:1, wobei die Ausprägung des Phänotyps abhängig von einer dominanten oder rezessiven Vererbung des Gens ist. Intermediäre Phänotypen kommen hierbei normalerweise nicht vor, allerdings kann das Vorhandensein von Polygenie, Redundanz oder multipler Allelie die Ausprägung des Phänotyps beeinflussen. Die Beteiligung weiterer Loci konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgeschlossen werden.

F2-Nachkommen aus Kreuzungen reinerbiger Eltern weisen im Allgemeinen einen Heterozygotiegrad von ungefähr 50% auf und schwach ausgeprägte Phänotypen können hierbei leicht durch die Aktivität anderer Gene beeinflusst oder maskiert werden. Dies wiederum kann zu intermediären Phänotypen und zu schwer erkennbaren Segregationsverhältnissen führen. Zur Identifikation der Gene die dem Phänotyp zugrunde liegen, empfiehlt es sich den Homozygotiegrad durch Rückkreuzung mit einem Elter zu erhöhen. Durch den gestiegenen Anteil homozygoter Loci kann in Rückkreuzungspopulationen ein besser überschaubareres Segregationsverhältnis erreicht werden, welches wiederum die Kartierung des verantwortlichen Gens erleichtert. Um dies zu erreichen, wurden aus jeder der fünf F2-Populationen mindestens vier Kandidaten mit einem starken Seitentriebdefekt ausgewählt und für Rückkreuzungen mit der *las* Mutante verwendet. Für die Kartierung wurde die 1. Tochtergeneration der 1. Rückkreuzung (BC1F1; siehe Kapitel 3.1.2.) geselbstet und die resultierende BC1F2-Nachkommenschaft diente als Population für die Grobkartierung (siehe Kapitel 3.1.4.).

3.1.1.3. Phänotypische Charakterisierung der Kreuzungspopulationen unter Langtagbedingungen

In der bestehenden Literatur wird die Ausprägung einiger Verzweigungsdefekte in Abhängigkeit von der Tageslänge beschrieben (Müller *et al.*, 2006; Yang, 2007; Raatz, 2009). So äußern sich Mutationen im Gen *RAX1*, einem Transkriptionsfaktor der R2R3 Myb-Genfamilie, in einer unterdrückten Anlage axillärer Meristeme während der frühen vegetativen Entwicklungsphase der Pflanze, wobei der Verzweigungsdefekt abhängig ist vom Wachstum der Pflanzen in kurzen Photoperioden (Müller *et al.*, 2006; Yang, 2009). Die Abhängigkeit von einer langen vegetativen Wachstumsphase zeigte sich ebenfalls in Analysen von Doppel- und Dreifachmutanten mit den verwandten Genen *RAX2* und *RAX3* (Müller *et al.*, 2006). Zur Überprüfung der Abhängigkeit des beschriebenen Phänotyps der F2-Pflanzen von der Tageslänge, wurden die drei F2-Populationen mit den stärksten Verzweigungsdefekten zusätzlich in Langtagbedingungen untersucht.

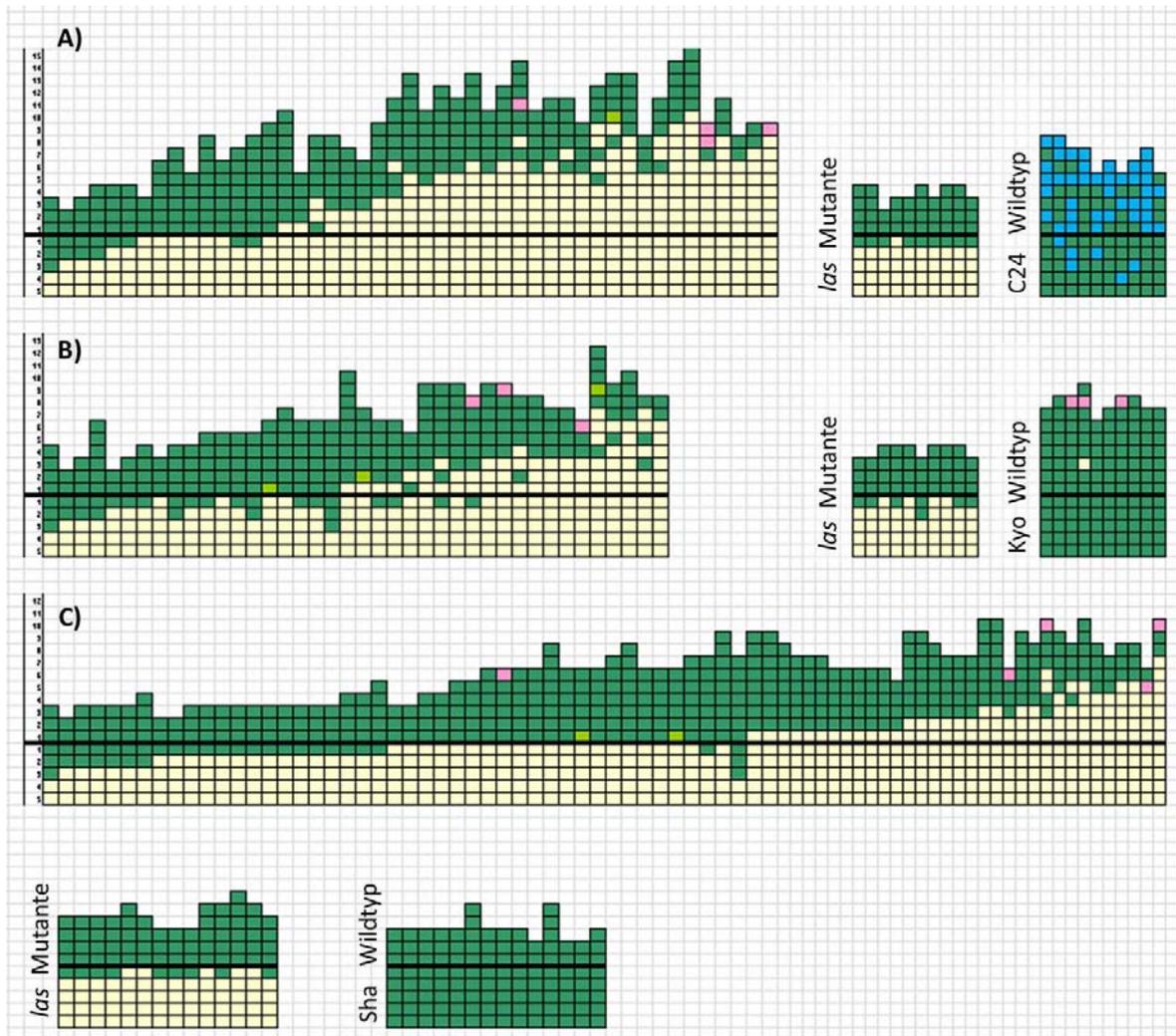


Abb. 3-4: Seitentriebbildung in F2-Populationen aus Kreuzungen der *las* Mutante mit den Ökotypen C24, Kyoto und Shahdara unter Langtagbedingungen.

F2-Population der Kreuzung: (A) *las*/C24 (n=47) mit Kontrollpopulationen der *las* Mutante und des Ökotyp C24; (B) *las*/Kyo (n=41) mit Kontrollpopulationen; (C) *las*/Sha (n=78) mit Kontrollpopulationen. Pflanzen wurden in Langtagbedingungen angezogen. Die Populationen sind nach dem berechneten Verzweigungsindex sortiert, absteigend von links nach rechts. Da ausschließlich Pflanzen im *las* Hintergrund untersucht wurden, werden nur die 5 jüngsten Rosettenblattachsen dargestellt. Farben: grün = Knospe/ Seitentrieb; gelb = Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs; hellgrün = Blatt anstelle einer Knospe/ Seitentriebs; blau = akzessorische Knospe; rosa = Blüte anstelle eines Seitentriebs.

Nachkommen der Kreuzung *las*/C24 ließen auch unter Langtagbedingungen den beschriebenen Seitentriebdefekt während der reproduktiven Phase der Entwicklung erkennen (Abb. 3-4 A). Unabhängig von der Tageslänge zeigten mehr als 50% der Gesamtpopulation ein von *las* abweichendes Verzweigungsmuster, vergleichbar mit Pflanzen die unter kurzen und anschließend langen Photoperioden gewachsen waren (Abb. 3-3 D). Im Vergleich zu den elterlichen Linien war die Anzahl an Stängelblätter in der Kreuzungspopulation unter Langtagbedingungen erhöht. Die Bildung akzessorischer

Seitentriebe in Stängelblattachsen wie sie im Ökotyp C24 zu beobachten war, konnte in der Kreuzungspopulation *las*/C24 nicht festgestellt werden. Der Phänotyp der Population *las*/Kyo war hingegen unter Langtagbedingungen schwächer ausgeprägt (Abb. 3-4 B). Durch die verkürzte vegetative Entwicklungsphase verlief die Bildung von Lateralmeristemen in Blattachsen des Haupttriebs in ungefähr zwei Dritteln der Population fehlerfrei, vergleichbar mit den elterlichen Linien. Nur ca. ein Drittel der Pflanzen zeigten ein abweichendes Verzweigungsmuster mit bis zu maximal 25% Seitentriebbildung in Stängelblattachsen. Pflanzen der Kreuzung *las*/Sha wiesen unter Langtagbedingungen einen sehr schwachen Verzweigungsdefekt auf (Abb. 3-4 C). Während unter kurzen und anschließenden Langtagbedingungen 40% der Gesamtpopulation in der Hälfte aller Stängelblattachsen eine Knospe bildeten (Abb. 3-3 F), zeigte sich dieser Defekt in Nachkommen die vollständig in langen Photoperioden angezogen wurden nur noch in 10% der Gesamtpopulation (Abb. 3-4 C).

In allen der drei untersuchten Populationen folgte die Anlage von Lateralmeristemen am Haupttrieb einem basipetalen Gradienten, wie sie auch unter kurzen und anschließenden Langtagbedingungen zu beobachten war. Ein Defekt in Stängelblattachsen konnte hauptsächlich in den ältesten Blattachsen ermittelt werden. Die Ergebnisse dieses Experiments deuten darauf hin, dass die zugrunde liegenden genetischen Mechanismen zwischen den verschiedenen Kreuzungspopulationen divergieren. Obgleich der ermittelte Seitentriebdefekt in nahezu allen Population identisch war, konnte in Nachkommen der Kreuzung *las*/Sha eine Abhängigkeit von der Tageslänge festgestellt werden, wohingegen der Defekt in Populationen von *las*/C24 und *las*/Kyo weitgehend unabhängig von einer langen vegetativen Entwicklungsphase der Pflanzen war.

3.1.2. Phänotypische Analyse der 1. Rückkreuzungsgeneration (BC1F1)

Um den genetischen Einfluss weiterer Faktoren auf die Ausprägung des Phänotyp zu reduzieren, wurde durch Rückkreuzung zur *las* Mutante der Anteil homozygoter Loci erhöht. Aus den F2-Kreuzungspopulationen der Ökotypen C24, Kyoto und Shahdara wurden Pflanzen mit einem verstärkten *las* Verzweigungsphänotyp ausgesucht und zur *las* Mutante zurückgekreuzt. Durch den geringeren Anteil segregierender Loci sollte ein eindeutigeres Segregationsverhältnis in der BC1F2 Population erreicht und dadurch die Kartierung des verantwortlichen Locus erleichtert werden. Um den maskierenden Einfluss

des genetischen Hintergrunds für die spätere Feinkartierung noch weiter zu reduzieren, wurden BC1F1 Pflanzen mit einem verstärkten *las* Verzweigungsdefekt zusätzlich zweimal zur *las* Mutante zurückgekreuzt. Nachkommen dieser Pflanzen wurden für die spätere Feinkartierung verwendet.

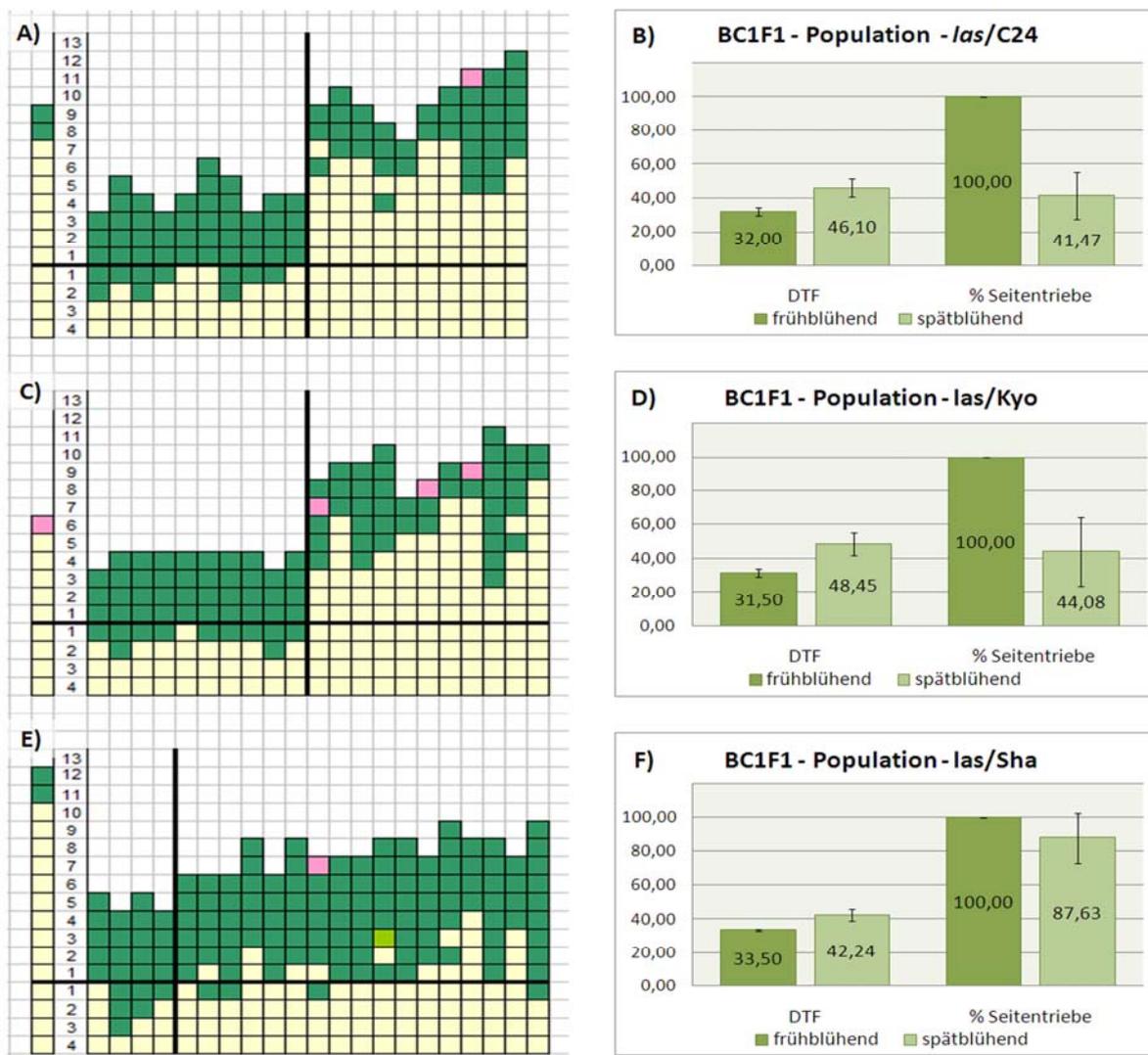


Abb. 3-5: Seitentriebbildung in BC1F1 Populationen unter Langtagbedingungen.

BC1F1-Populationen der Rückkreuzungen (A) *las/C24* (n=20), (C) *las/Kyo* (n=21), (E) *las/Sha* (n=21). Die erste Spalte zeigt den Phänotyp des für die Rückkreuzung zur *las* Mutante verwendeten F2-Kandidaten. Die vertikal verlaufende, verdickte Linie stellt die Grenze zwischen früh- und spätblühenden Pflanzen dar; frühblühend: <35 Tage bis zur Blüte; spätblühend: >35 Tage bis zur Blüte. Pflanzen wurden in Langtagbedingungen angezogen. Die Populationen in (A), (C) und (E) sind nach „Tage bis zur Blüte“ (DTF) sortiert, aufsteigend von links nach rechts. (B, D, F) Graphische Darstellung des Blühzeitpunkts und der Seitentriebbildung in Stängelblattachsen von früh- und spätblühenden Pflanzen der BC1F1 Populationen aus (A), (C) und (E). Vertikale Fehlerindikatoren: Standardabweichung. Farben: grün = Knospe/ Seitentrieb; gelb = Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs; hellgrün = Blatt anstelle einer Knospe/ Seitentriebs; rosa = Blüte anstelle einer Knospe/ Seitentriebs.

Die 1. Rückkreuzungsgeneration der ausgewählten Kandidaten wurde unter Langtagbedingungen angezogen. Aufgrund vorheriger Aufspaltungsverhältnisse wurde angenommen, dass es sich entweder um die Vererbung unvollständiger Dominanz handelt, oder dass ein dominant-rezessiver Erbgang dem Phänotyp zugrunde liegt. Bei einem Erbgang mit unvollständiger Dominanz würde die 1. Tochtergeneration der Rückkreuzung im Verhältnis 1:1 aufspalten und neben dem intermediären Phänotyp, auch den Phänotyp der rezessiven, elterlichen Linie zeigen die für die Rückkreuzung verwendet wurde. Bei einer dominant-rezessiven Vererbung ergäben sich, abhängig von der genetischen Konstitution des zurück gekreuzten Kandidaten, folgende Phänotypen in der Nachkommenschaft: bei der rezessiven Vererbung eines Gens würde eine uniforme BC1F1 Population erwartet unabhängig davon, ob der Kandidat der für die Rückkreuzung verwendet wurde, homo- oder heterozygot für das verantwortliche Gen war. Bei der Vererbung eines dominanten Gens wäre die 1. Rückkreuzungsgeneration nur dann uniform, wenn in dem Elter das entsprechende Gen homozygot vorgelegen hätte. Im Falle eines heterozygoten Zustands wäre eine phänotypische Aufspaltung im Verhältnis 1:1 zu beobachten.

In den beiden BC1F1 Rückkreuzungspopulationen von *las/C24* und *las/Kyo* konnte ein eindeutiges Segregationsverhältnis von 1:1 festgestellt werden. Dabei traten Pflanzen auf die einen *las* Phänotyp aufwiesen, sowie Pflanzen die eine Abweichung vom *las* Verzweigungsmuster zeigten (Abb. 3-5 A und C). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass das für den Phänotyp verantwortliche Gen entweder dominant und im rückgekreuzten F2-Kandidaten in heterozygoten Zustand vorgelegen haben musste, oder dass ein Erbgang mit unvollständiger Dominanz vorlag. Zusätzlich zu dem Defekt in der Anlage von Lateralmeristemen konnte in den Populationen mit C24 und Kyo eine Kosegregation mit einem spätblühenden Phänotyp beobachtet werden (Abb. 3-5 B und D). So bildeten frühblühende Pflanzen in allen Stängelblattachseln reproduktive Seitentriebe, während die Anlage von Knospen in spätblühenden Pflanzen in vielen Blattachseln unterdrückt war. Nachkommen der Rückkreuzung aus *las/C24* die keinen verstärkten *las* Verzweigungsdefekt aufwiesen, blühten durchschnittlich nach 32 ($\pm 2,44$) Tagen. Pflanzen die hingegen nur in ca. 41% der geformten Blattachseln Seitentriebe bildeten, blühten durchschnittlich erst nach 46,1 ($\pm 5,5$) Tagen (Abb. 3-5 B). Nachkommen der Kreuzung *las/Kyo* verhielten sich ähnlich wie Pflanzen der Population *las/C24*. Frühblühende Nachkommen der Population *las/Kyo* bei denen keine Abweichung vom

Verzweigungsmuster der *las* Mutante festgestellt werden konnte, zeigten eine frühe Blüte nach durchschnittlich 31,5 ($\pm 2,29$) Tagen (Abb. 3-5 D), vergleichbar mit Pflanzen aus der Rückkreuzung *las/C24*. Pflanzen aus der BC1F1 Population von *las/Kyo* bei denen die Anlage axillärer Meristeme in ungefähr 56% der Blattachsen am Haupttrieb unterdrückt war, blühten ebenfalls spät nach 48,4 ($\pm 6,41$) Tagen. Im Vergleich zu Pflanzen die einen frühen Blühzeitpunkt aufwiesen, war die Anzahl an Stängelblättern in spätblühenden Pflanzen in beiden BC1F1 Populationen erhöht (Abb. 3-5 A und C).

Statistische *t*-Test Analysen bestätigen sowohl in der Rückkreuzungspopulation von *las/C24*, als auch in *las/Kyo*, eine negative Korrelation von -0,74 und -0,78 zwischen dem prozentualen Anteil gebildeter Seitentriebe in Stängelblattachsen und dem Blühzeitpunkt der Pflanzen. Ebenso konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl an Stängelblättern, sowie den Tagen bis zur Blüte von 0,88 in der BC1F1-Population von *las/C24*, und 0,9 in *las/Kyo* ermittelt werden. Alle berechneten Korrelationen sind signifikant ($p \leq 0,01$; Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigten vier von fünf BC1F1 Population unterschiedlicher F2-Kandidaten aus *las/C24* eine phänotypische Aufspaltung im Verhältnis 1:1. Nur eine der fünf Populationen war uniform spätblühend und spiegelte einen intermediären Verzweigungsphänotyp wider. In zwei der drei betrachteten Rückkreuzungspopulationen verschiedener F2-Kandidaten von *las/Kyo* konnte ebenfalls ein Segregationsverhältnis von 1:1 festgestellt werden. Die dritte Population war, wie auch bei *las/C24*, spätblühend uniform mit einem intermediären Verzweigungsphänotyp (Daten nicht gezeigt).

Die Feststellung, dass der beobachtete Verzweigungsphänotyp in beiden Populationen der Ökotypen C24 und Kyoto im Verhältnis 1:1 aufspaltete, mit einem späten Blühzeitpunkt kosegregierte und scheinbar unabhängig von der Tageslänge zur Ausprägung kommen konnte, ließ vermuten, dass dem Phänotyp in beiden Kreuzungen der gleiche genetische Mechanismus zugrunde lag.

Im Gegensatz zu den Rückkreuzungen von *las/C24* und *las/Kyo* zeigte sich die BC1F1 Population von *las/Sha*, bis auf wenige Einzelpflanzen, uniform ohne einen verstärkten *las* Verzweigungsdefekt in Stängelblattachsen (Abb. 3-5 E). Das klare 1:1 Segregationsverhältnis des spätblühenden Phänotyps in *las/C24* und *las/Kyo*, war in Pflanzen der Rückkreuzung *las/Sha* nicht erkennbar und BC1F1-Pflanzen zeigten bezüglich des verzögerten Blühzeitpunkts einen intermediären Phänotyp. Die Klassifizierung in früh- und spätblühende Pflanzen ergab für frühblühende Nachkommen

aus *las/Sha* durchschnittlich 33,5 ($\pm 0,5$) Tage, wohingegen Pflanzen mit einem späten Blühzeitpunkt durchschnittlich 42,2 ($\pm 3,52$) Tage zum Öffnen der ersten Blüte benötigten (Abb. 3-5 F). Insgesamt wurden zwei Rückkreuzungen unterschiedlicher F2-Kandidaten betrachtet, wobei die zweite Rückkreuzungspopulation phänotypisch vergleichbar mit der in Abb. 3-5 E dargestellten Population war. Die bisherigen Ergebnisse, sowie die Resultate dieser BC1F1 Rückkreuzung von *las/Sha* deuteten darauf hin, dass der verantwortliche Locus mit großer Wahrscheinlichkeit rezessiv vererbt wird und die Ausprägung des Phänotyp stark abhängig ist von einer langen vegetativen Entwicklungsphase der Pflanze.

3.1.3. Phänotyp des *las* „Enhancers“ aus dem Ökotyp C24

Die BC1F2 Kartierungspopulation spiegelte den bereits in der Rückkreuzung beobachteten kosegregierenden Phänotyp wider (Abb. 3-6 A). Dabei traten ca. 18% frühblühende Pflanzen auf in denen die Seitentriebbildung in Stängelblattachsen nicht beeinträchtigt war (Abb. 3-6 A und B), ungefähr 64% spätblühende Pflanzen mit intermediären Phänotypen (Abb. 3-6 A), sowie ca. 18% spätblühende Pflanzen mit starken Defekten in der Anlage von Lateralmeristemen (Abb. 3-6 A, D, E und H; Tab. 3-1). Durch die Rückkreuzung zur *las* Mutante wich die phänotypische Verteilung des Verzweigungsdefekts in BC1F2-Pflanzen leicht von dem in der F2-Population ermittelten Segregationsverhältnis von 1:2:1 ab (siehe Kapitel 3.1.2; Tab. 3-1). In der BC1F2 Population zeigten überdurchschnittliche viele Pflanzen einen intermediären Phänotyp. Es wurde vermutet, dass der weiterhin vorhandene, hohe Heterozygotiegrad von Col-0 und C24-Allelen und die damit verbundenen epigenetischen Interaktionen verschiedener Loci, die Ursache für das unklare Segregationsverhältnis und den hohen Anteil intermediärer Phänotypen war.

Phänotypen der BC1F2 Kartierungspopulation (n=348)	<i>las</i> Phänotyp (>75% Seitentriebe)	Intermediärer Phänotyp	Enhancer (<25% Seitentriebe)
erwartete Segregation	85	174	85
tatsächliche Segregation	64 (18,3%)	222 (63,8%)	62 (17,8%)

Tab. 3-1: Verteilung der Phänotypen in der BC1F2 Kartierungspopulation der Kreuzung *las/C24*.

Dargestellt sind die erwarteten Zahlen der Segregation, sowie die tatsächlich ermittelte Anzahl an Pflanzen der drei phänotypischen Klassen *las*, intermediär und verstärkter *las*-Phänotyp (Enhancer). In Klammern angegeben ist der prozentuale Anteil der Pflanzen zur Gesamtpopulation.

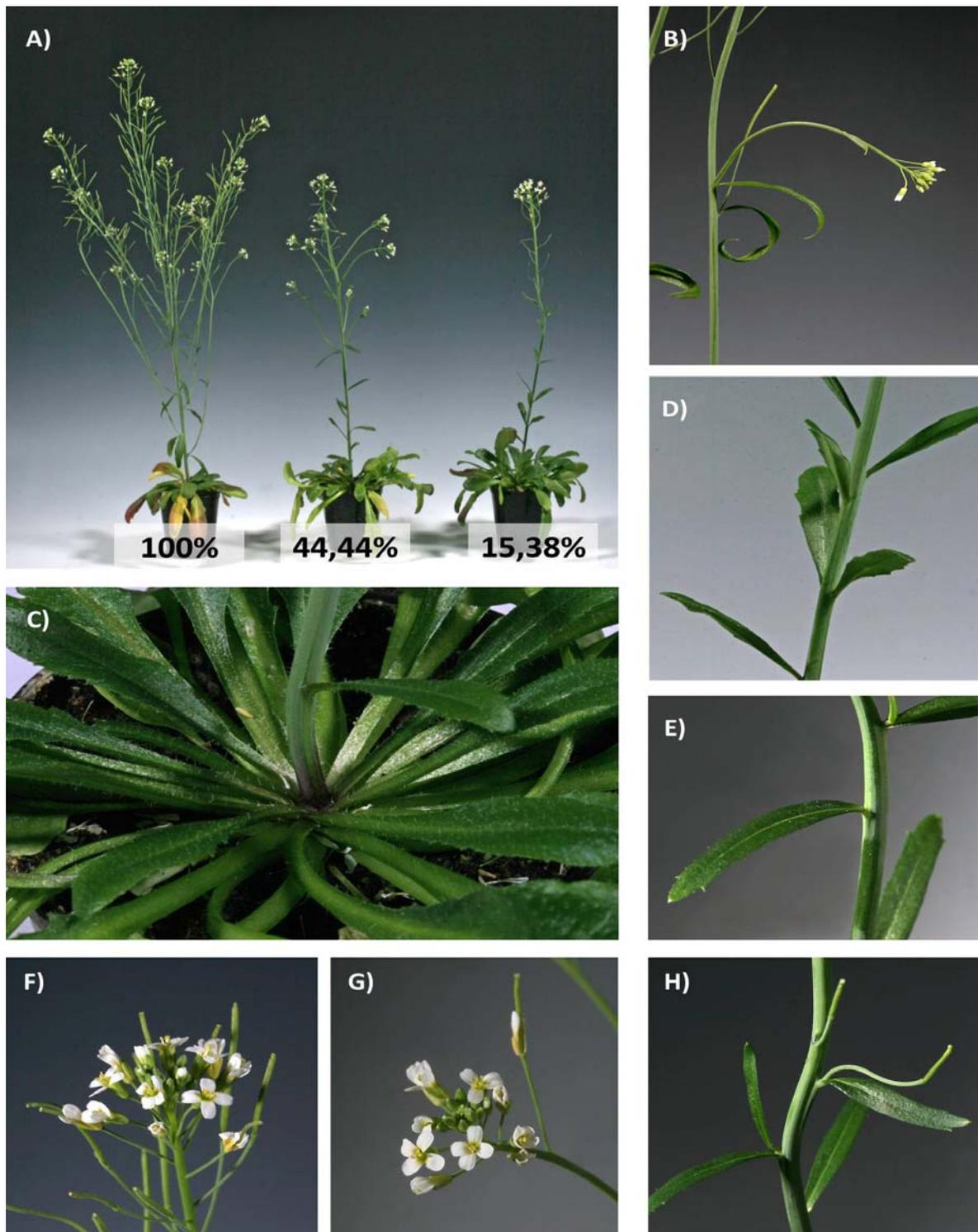


Abb. 3-6: Phänotyp der BC1F2 Kartierungspopulation der Kreuzung *las/C24*.

(A) BC1F2-Pflanzen der Kreuzung *las/C24*. Links: frühblühende Pflanze ohne Seitentriebdefekt, Mitte, Rechts: spätblühende Pflanzen mit intermediärem und starkem Verzweigungsphänotyp. Der prozentuale Anteil an Seitentrieben in Stängelblattachseln ist angegeben. (B) Normale Seitentriebbildung in Stängelblattachsel einer frühblühenden Pflanze. (C, D, E, F, H) Nahaufnahmen der spätblühenden Pflanze aus A (rechts). (C) Aufnahme der Blattrosette. Die Seitentriebbildung ist durch die *las* Mutation unterdrückt. (D) Stängelausschnitt mit sichtbarem Seitentriebdefekt in Blattachseln und aufrechter Blattstellung. (E) Nachaufnahme eines Stängelblattes ohne Achselknospe. (F) Blütenstand. (G) Blütenstand der frühblühenden Pflanze aus A (links). (H) Stängelblattaufnahme. Seitentriebe terminieren als Blätter oder Blüten. Pflanzen wurden sechs Wochen in Kurztag- und anschließenden Langtagbedingungen angezogen.

Neben dem Seitentriebdefekt in der reproduktiven Phase der Entwicklung konnte festgestellt werden, dass in nahezu allen Nachkommen die Anlage von Knospen selbst in den jüngsten Rosettenblattachsen unterdrückt war (Abb. 3-6 C), vergleichbar mit der Kontrollpopulation der *las* Mutante (Daten nicht gezeigt). Am Haupttrieb folgte die Anlage von Lateralmeristemen weiterhin einem basipetalen Gradienten, so dass hauptsächlich in den ältesten Blattachsen die Knospenbildung unterdrückt war. Blätter in deren Achseln keine Seitentriebe angelegt wurden, zeigten eine besonders aufrechte Blattstellung (Abb. 3-6 D). Ungefähr 6% der angelegten Lateralmeristeme in Stängelblattachsen von BC1F2-Nachkommen besaßen eine florale Identität und bildeten Einzelblüten, ein sehr geringer Anteil der Lateralmeristeme von 0,6% terminierte als Blätter (Abb. 3-6 H). In der Kontrollpopulation des Ökotyp C24 konnte weder die Bildung von Blättern, noch die Bildung von Blüten in Stängelblattachsen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die *las* Kontrollpopulation zeigte ebenfalls keine Bildung von Blättern in Stängelachsen, allerdings wurden in 2,9% der Blattachsen Blüten anstelle von Seitentrieben gebildet (Daten nicht gezeigt).

Spätblühende Pflanzen mit einem starkem Seitentriebdefekt wiesen kompaktere Blütenstände auf und formten mehrere, sowie größere Blüten, als Infloreszenzen von frühblühenden Pflanzen mit normaler Seitentriebbildung (Abb. 3-6 F und G). Pflanzen mit einem verstärkten *las* Verzweigungsdefekt zeigten außerdem eine starke Verdickung des Haupttriebs, welches die Standfestigkeit des Stängels steigerte (Abb. 3-6 C). Zusätzlich war in diesen Pflanzen die Länge des Haupttriebes erhöht, so dass Pflanzen mit einer Stängellänge von bis zu 125cm gemessen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Es wurde davon ausgegangen, dass die beobachteten pleiotropen Phänotypen durch einen Heterosiseffekt der elterlichen Inzuchtlinien verursacht werden.

3.1.4. Grobkartierung des *las* Enhancers aus C24

Grundvoraussetzung für die Kartierung eines Gens ist die Ausprägung eines stabilen, sowie reproduzierbaren und leicht zu ermittelnden Phänotyps. Zur Identifikation des Locus welcher den Phänotyp verursacht, muss die entsprechende Linie zu einer genetisch divergenten Linie gekreuzt werden, um eine genügend hohe Anzahl genetischer Polymorphismen zu gewährleisten. Um herauszufinden welche chromosomalen Regionen von welchem Elter stammen, werden alle Kreuzungsnachkommen unter Verwendung molekularer Marker auf Genomebene untersucht. Die Genauigkeit der Kartierung ist dabei abhängig von der Markerdichte. Durch den anschließenden Vergleich zwischen Phänotyp und Genotyp wird versucht eine Kopplung zu identifizieren, da molekulare Marker die nahe dem verantwortlichen Gen liegen eine näherungsweise Anhäufung von Allelen genau jenes Elters zeigen, dessen genetischer Hintergrund als Ursache dem Phänotyp zugrunde liegt.

Zur schnellen Identifikation solch genomischer Marker welche mit dem Phänotyp gekoppelt sind, wurde eine „Bulk Segregant Analysis“ (BSA; Becker *et al.*, 2010) mit anschließendem Microarray-Experiment durchgeführt. Bei der BSA wird die Kartierungspopulation in „Bulks“ aufgeteilt, auch „Pool“ genannt, wobei jeder Bulk mehrere Pflanzen enthält welche spezifisch sind für eine bestimmte phänotypische Klasse, wie beispielsweise wildtypische oder mutante Pflanzen (Becker *et al.*, 2010). In der folgenden Marker-Analyse werden die Bulks untersucht und anschließend miteinander verglichen. Dabei sollten in der Analyse des Mutanten-Pool chromosomale Bereiche auftreten die eine Allel-Anhäufung von genau jenem Elter zeigen, dessen genetischer Hintergrund die Ausprägung des Phänotyps verursacht.

Da die Ausprägung des verstärkten *las* Verzweigungsdefekts am deutlichsten in Kreuzungspopulationen mit dem Ökotyp C24 zu beobachten war, wurde von nun an ausschließlich mit Pflanzen der Kreuzung *las*/C24 gearbeitet. Für die Grobkartierung des verantwortlichen Gens diente die BC1F2 Population, die sechs Wochen unter Kurztag- und anschließenden Langtagbedingungen angezogen worden war.

Unter Verwendung der BSA wurde für jede phänotypische Klasse ein Bulk erstellt: der erste Bulk enthielt Pflanzen die ein *las* Verzweigungsmuster aufwiesen (>75% Seitentriebe), wohingegen der zweite, so genannte Mutanten-Bulk, nur Pflanzen beinhaltete die einen verstärkten *las* Defekt zeigten (<25% Seitentriebe). Für die

anschließende Kartierung wurde ein *AtSNPtile1* Array verwendet. Der *AtSNPtile1* Array ist ein *tiling* Array und enthält einerseits 1,4Mio. spezifische 25bp Oligonukleotide welche das gesamte *Arabidopsis thaliana* Genom abdecken (Zhang and Borevitz, 2009), sowie zusätzlich 250.000 SNP-Sonden aus Resequenzierungen von 20 verschiedenen Ökotypen (Clark *et al.*, 2007). Durch die extrem hohe Markerdichte eignet sich dieser *AtSNPtile1* Array, sowie auch andere „High-Density Oligonucleotide Arrays“, sowohl für Expressionsstudien, als auch für Genotypisierungen, und kann daher für die Genkartierung verwendet werden (Borevitz, 2006). Da der verstärkte *las* Seitentriebdefekt während der reproduktiven Entwicklungsphase durch Kreuzung zum Ökotyp C24 entstanden ist, sollte bei der Auswertung der Array-Daten des Mutanten-Bulk, eine Anhäufung von C24-Allelen in einem bestimmten chromosomalen Bereich auftreten.

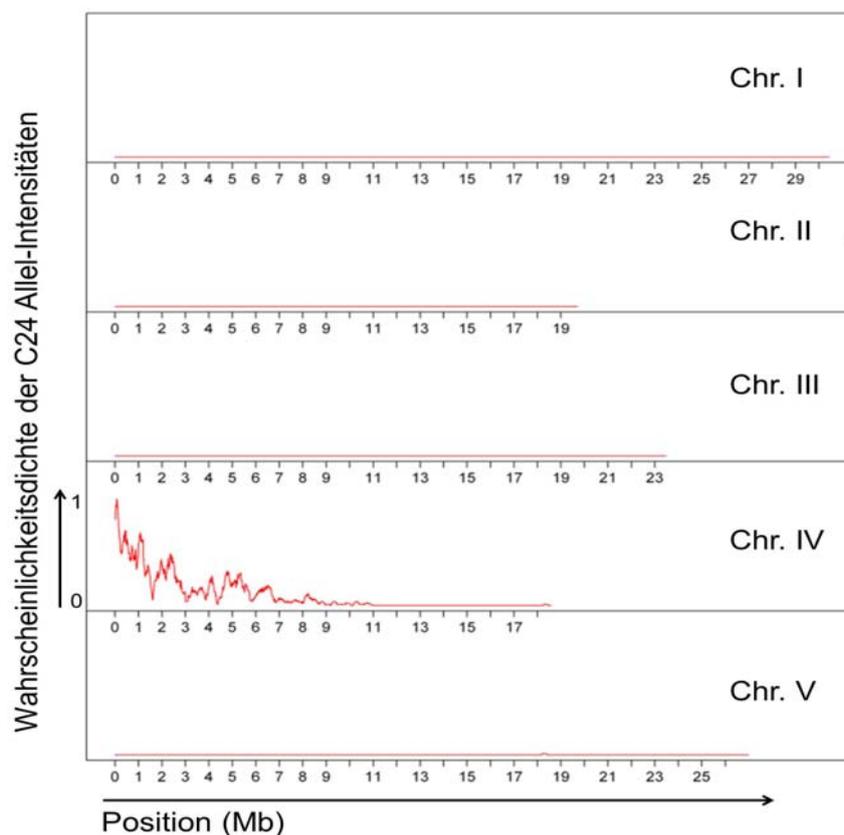


Abb. 3-7: C24-Allelfrequenz im Genom von Pflanzen mit einem verstärkten *las* Verzweigungsdefekt.

Wahrscheinlichkeitsdichte der C24-Allel-Intensität = *probability density function of C24 SNP*. Eine Anhäufung von C24-Allelen ist ausschließlich im oberen Bereich von Chromosom IV zu beobachten.

Bei der Microarray-Auswertung des Mutanten-Bulk konnte ausschließlich auf Chromosom IV eine erhöhte C24-Allelfrequenz festgestellt werden (Abb. 3-7). Die Chromosomen I, II, III und V zeigten keine erhöhte Anhäufung von C24-Allelen. Die genauere Betrachtung identifizierte zwei Regionen im oberen Bereich des kurzen Arms auf Chromosom IV, die eine signifikante Anhäufung von Allelen des Ökotyp C24 aufwiesen (Abb. 3-8).

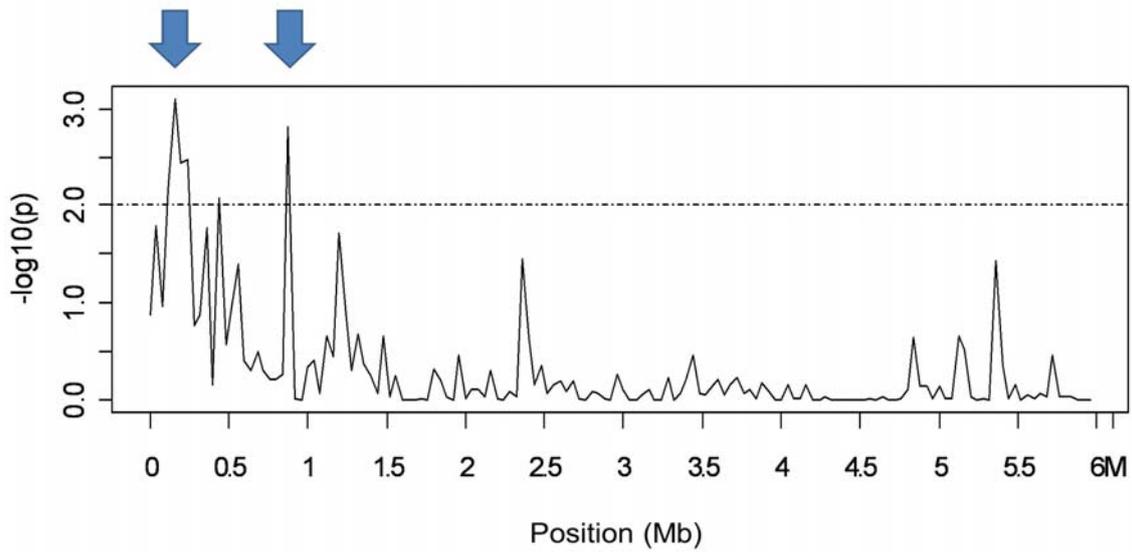


Abb. 3-8: C24-Allelfrequenz im oberen Bereich des kurzen Arms von Chromosom IV in Pflanzen mit einem verstärkten *las* Verzweigungsdefekt (*las*-Enhancer).

In *las*-Enhancer-Pflanzen wurden zwei Bereiche (siehe Pfeile) identifiziert, die eine signifikante Anhäufung von C24-Allelen zeigen. Signifikanzgrenze: $-\log_{10}(2,0) = p \leq 0,05$.

Die erste Region umfasste den Bereich von 120.000bp bis 280.000bp, wobei in dem chromosomalen Abschnitt von 160.000bp bis 200.000bp der niedrigste Signifikanzwert (0,0007) ermittelt werden konnte (Tab. 3-2). Die angrenzenden Bereiche von 80.000bp bis 120.000bp, sowie 280.000bp bis 320.000bp zeigten bereits eine Anhäufung von C24-Allelen durch niedrige p -Werte von $\sim 0,1$. Die Annäherung in solchen Bereichen kann dadurch erklärt werden, dass es während der Meiose zu Rekombinationen chromosomaler Abschnitte kommt. Dadurch können Nachkommen entstehen, die phänotypisch „mutant“ sind, jedoch an Marker-Positionen nahe dem verantwortlichen Gen das Allel des wildtypischen Elters tragen. Da Rekombinationsereignisse je nach Chromosomenbereich sehr selten sein können, lässt sich in einem Großteil der getesteten Individuen eines Bulks immer noch eine Allel-Anhäufung jenes Elters nachweisen, der den Phänotyp verursacht.

Die zweite Region mit einem Signifikanzwert $<0,05$ umfasste den genomischen Abschnitt von 880.000bp bis 920.000bp. Die benachbarten Bereiche von 840kb bis 880kb, sowie 920kb bis 960kb zeigten keine signifikante Annäherung. Es wurde vermutet, dass das verantwortliche Gen für den Seitentriebdefekt während der reproduktiven Entwicklungsphase von *las* Mutanten, eher in der Region 1 als in der Region 2 lokalisiert ist. Da jedoch die Anhäufung der Allele des Ökotyp C24 mit einem p -Wert $<0,05$ nicht zufällig sein kann, wurde für die Feinkartierung des Locus der gesamte chromosomale Bereich von 120kb bis 920kb im oberen Abschnitt des kurzen Arms auf Chromosom IV berücksichtigt. In den unter Tab. 3-2 angegebenen chromosomalen Bereichen detektierten ungefähr 35% der auf dem Array vorhandenen Sonden einen Polymorphismus zwischen den Ökotypen Columbia und C24 (angegeben als „SNP polymorph“).

	Bp Position auf Chr. IV	Bp Position auf Chr. IV	SNP (gesamt)	SNP (polymorph)	<i>p</i> -Wert
	80.000	120.000	73	20	0,107843547
Region 1	120.000	160.000	69	25	0,006682423
Region 1	160.000	200.000	60	26	0,000789031
Region 1	200.000	240.000	54	22	0,00356946
Region 1	240.000	280.000	43	19	0,003275664
	280.000	320.000	30	9	0,169931937
			
	840.000	880.000	30	6	0,541406889
Region 2	880.000	920.000	78	30	0,001506327
	920.000	960.000	17	1	0,958959635

Tab. 3-2: Auswertung des *SNPtile1* Array Experiments der *las*/C24 BC1F2 Population.

Dargestellt sind die auf Chromosom IV identifizierten Regionen 1 und 2 mit signifikanter Anhäufung von C24 Allelen (p -Wert) und deren Annäherung, sowie deren chromosomale Positionen in Basenpaaren. Zusätzlich angegeben ist die Gesamtanzahl vorhandener Sonden für die entsprechenden Bereiche auf dem *SNPtile1* Array (SNP gesamt), sowie die ermittelte Anzahl von Sonden, die einen Polymorphismus zwischen den Ökotypen Columbia und C24 in den entsprechenden Bereichen detektieren (SNP polymorph). p -Wert: $p \leq 0,05$.

3.1.5. Feinkartierung des *las* Enhancers aus C24 in Rückkreuzungspopulationen

Zur Identifikation des *las* Enhancers aus dem Ökotyp C24 wurden für die Feinkartierung F2 und F3 Populationen der dritten Rückkreuzung unter Langtagbedingungen eingesetzt. Im Vergleich zu den F2 Populationen der Kreuzung *las*/C24 war der Seitentriebdefekt in

Stängelblattachsen der BC3F2 Population unter gleichen Wachstumsbedingungen schwächer ausgeprägt (Abb. 3-9; Abb. 3-4 A). Nur 24,4% der BC3F2-Pflanzen bildeten in der Hälfte aller Stängelblattachsen ein axilläres Meristem (Abb. 3-9 A), wohingegen es in der F2 Populationen unter Langtagbedingungen noch ~40% der Pflanzen waren (Daten nicht gezeigt). Um genügend Nachkommen zu erhalten, die eine Rekombination in dem zu untersuchenden chromosomalen Bereich zeigten, wurden mehrere Populationen des gleichen Elters mit einem Abstand von drei Wochen ausgelegt. Dabei konnte festgestellt werden, dass Pflanzen die drei Wochen nach der ersten Population ausgelegt wurden, einen noch schwächeren Phänotyp aufwiesen und nur noch ~9% der Pflanzen legten in der Hälfte aller Stängelblattachsen Knospen an (Abb. 3-9 A und B).

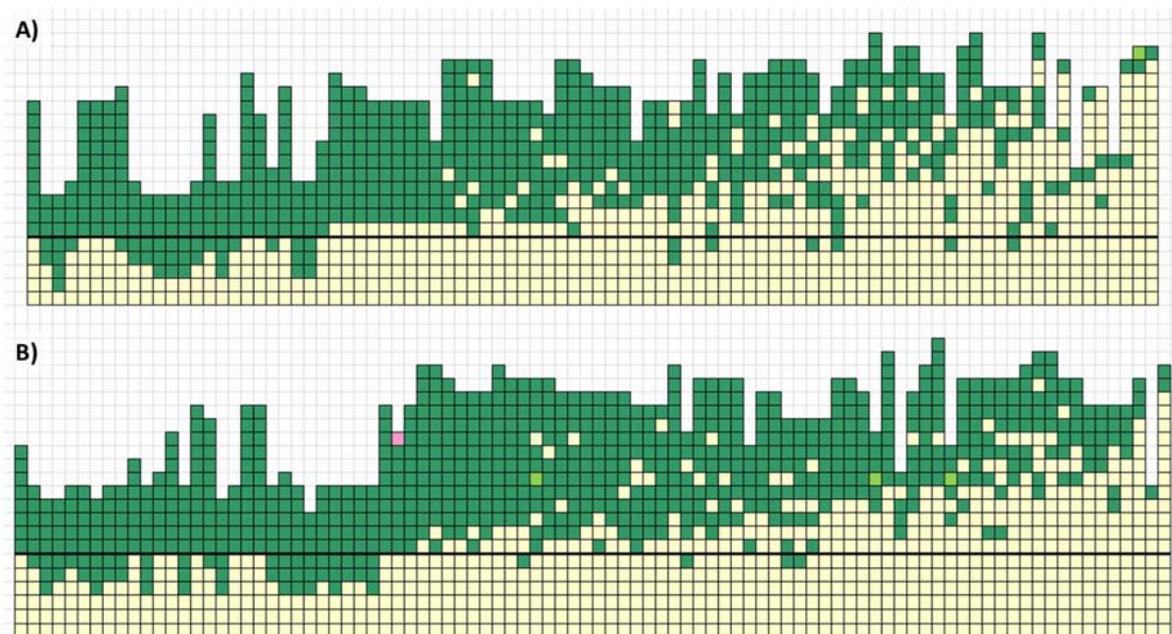


Abb. 3-9: Seitentriebbildung in BC3F2 Populationen der Kreuzung *las*/C24.

(A) BC3F2 Populationen der Kreuzung *las*/C24. (B) BC3F2 Populationen des gleichen Elters aus (A) wurde mit einem Abstand von drei Wochen erneut unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogen. Der verstärkte *las* Verzweigungsdefekt ist in den BC3F2 Populationen schwächer, als in der 2. Tochtergeneration unter gleichen Wachstumsbedingungen (siehe Abb. 3-4). Die Populationen sind nach dem berechneten Verzweigungsindex sortiert, absteigend von links nach rechts. Farben: grün = Knospe/ Seitentrieb; gelb = Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs; hellgrün = Blatt anstelle einer Knospe/ Seitentriebs; rosa = Blüte anstelle eines Seitentriebs. Die Pflanzen wurden im Monat Dezember unter Langtagbedingungen angezogen.

Auffällig war ebenfalls, dass die Seitentriebbildung in BC3F2 Pflanzen nicht mehr eindeutig einem basipetalen Gradienten folgte, wie es in den F2 Populationen beobachtet werden konnte (Abb. 3-4 A). In diesen F2-Pflanzen zeigte sich der Seitentriebdefekt während der reproduktiven Phase hauptsächlich in den ältesten Stängelblattachsen und

Blattachsen nahe dem Sprossapikalmeristem waren nicht betroffen. In den BC3F2-Nachkommen hingegen traten viele Pflanzen auf, bei denen die Seitentriebbildung in den ältesten Stängelblattachsen normal verlief, jedoch in jüngeren Blattachsen unterdrückt war (Abb. 3-9 A und B). Es wurde vermutet, dass die Variabilität des beobachteten Phänotyps abhängig ist von Umweltfaktoren wie Bodenzusammensetzung, Wasserangebot oder Schädlingsvorkommen.

	MARKER	S153	S143	S172	S149	S151	BS60	S186	S184	S182	S180	S176
	SNP POS.	123.279	143.127	188.754	219.312	253.113	268.716	301.021	331.479	398.078	605.948	900.093
	0,00	h	h	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24
	6,67	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	h	h
	23,08	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	h	h
	33,33	h	h	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24
▶	35,71	h	h	h	h	h	h	h	h	h	C24	C24
	35,71	C24	C24	C24	h	h	h	h	h	h	h	h
	38,46	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	h	h
	45,45	C24	C24	h	h	h	h	h	h	h	h	h
	50,00	C24	C24	C24	C24	h	h	h	h	h	h	h
▶	53,85	h	h	h	h	h	h	h	h	h	C24	C24
	61,54	C24	C24	h	h	h	h	h	h	h	h	h
	63,64	h	h	h	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24	C24
	76,92	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	C24
	91,67	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	C24
	33,33	h	h	h	h	h	h	h	h	h	← Col	→ Col
	37,50	C24	C24	C24	C24	h	h	h	h	h	← Col	→ Col
	38,46	← Col	→ Col	← Col	→ Col	h	h	h	h	h	h	h
	58,33	h	h	h	h	h	h	h	h	← Col	→ Col	→ Col
	36,36	← Col	→ Col	h	h	h	h	h	h	h	h	h
*	100,00	Col	Col	Col	h	← h	h	h	h	h	h	h
	46,15	← Col	→ Col	← Col	→ Col	h	h	h	h	h	h	h
*	88,89	Col	Col	Col	h	← h	h	h	h	h	h	h
	63,64	← Col	→ Col	← Col	→ Col	h	h	h	h	h	h	h
	75,00	Col	Col	Col	Col	Col	h	h	h	h	h	h
	100,00	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	h	← h	h	h
	100,00	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	h	← h	h
	100,00	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	← h	h
	100,00	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	← h
	100,00	h	h	→ Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col
	100,00	h	h	h	→ Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col
	100,00	h	h	h	h	h	h	→ Col	Col	Col	Col	Col
	41,67	h	h	h	h	h	h	h	Col	Col	Col	Col
*	92,86	h	h	h	h	h	h	h	→ Col	Col	Col	Col
	69,23	h	h	h	h	h	h	h	h	Col	Col	Col
*	100,00	h	h	h	h	h	h	h	h	→ Col	Col	Col
		S153					14,61 cM					S176

Abb. 3-10: Feinkartierung in rekombinanten Pflanzen der BC3F2 Kartierungspopulation.

Dargestellt sind Rekombinanten der BC3F2 Population (Zeilen) die eine Rekombination in dem untersuchten Bereich von 120kb bis 900kb auf Chromosom IV aufweisen, sowie deren genetische Komposition an verschiedenen Marker-Positionen (Spalten). Am Beginn jeder Zeile ist für jede Pflanze die phänotypische Ausprägung in „% Seitentriebe in Stängelblattachsen“ angegeben; rot-markierte Pflanzen zeigten einen frühblühenden Phänotyp. Boxen: blau = C24 homozygot, gelb = heterozygot, grün = Columbia homozygot. Schwarze Pfeile deuten in die Richtung des verantwortlichen Locus. Rote Pfeile zeigen widersprüchliche Ergebnisse. *: Rekombinanten mit widersprüchlichen Ergebnissen. Blaue Pfeilspitzen: rekombinante Pflanzen mit der gleichen genetischen Konstitution in dem untersuchten Bereich, aber unterschiedlichen Ausprägungen des Verzweigungsdefekts. Die Rekombinationsfrequenz zwischen den Markern S153 und S176 (120kb bis 900kb) ist unterhalb der Grafik in cM angegeben.

Pflanzen der BC3F2 Populationen wurden phänotypisiert und die in der Grobkartierung erfasste Region von 120kb bis 900kb mit molekularen Markern untersucht (Abb. 3-10). Die Studien zur Vererbung des *las* Enhancers konnten nicht eindeutig aufklären, ob das verantwortliche Gen nun dominant vererbt wird, oder ob ein Erbgang mit unvollständiger Dominanz vorliegt. Da im Falle eines dominanten Erbgangs der Phänotyp auch in heterozygotem Zustand zur Ausprägung käme, konnten Pflanzen die in dem untersuchten Bereich entweder C24 homo- oder heterozygot an verschiedenen Marker-Positionen waren, nicht berücksichtigt werden. Durch Vergleichsanalysen von Genotyp und Phänotyp derer Pflanzen die Rekombinationsereignisse in der untersuchten Region zeigten, konnte die Position der verantwortlichen Mutation näher bestimmt werden. Der Bereich des verantwortlichen Gens wurde durch die molekularen Marker S151 und S184 an den Positionen 253kb und 331kb im oberen Bereich von Chromosom IV eingegrenzt. Alle Pflanzen die an diesen beiden Markern homozygot Columbia waren, zeigten einen frühblühenden Phänotyp ohne Defekte in der Anlage von Lateralmeristemen. Die meisten anderen Pflanzen die an diesen Positionen Homo- oder Heterozygotie des Ökotyp C24 aufwiesen, spiegelten einen intermediären Phänotyp wider. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die verantwortliche Mutation in dem von den Markern S151 und S184 eingegrenzten Bereich lag.

Neben der Tatsache, dass nur Pflanzen genügend Informationsgehalt über die Position der Mutation besaßen, die nicht homo- und heterozygot für den Ökotyp C24 in dem betrachteten Bereich waren, erschwerte die Variabilität und die schwache Ausprägung des Phänotyps die Feinkartierung. So traten bei der genotypischen und phänotypischen Vergleichsanalyse einiger Nachkommen auch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Position des verantwortlichen Locus auf (Abb. 3-10; *gekennzeichnete Pflanzen). Zusätzlich konnten Rekombinanten ermittelt werden, die in der betrachteten Region die gleiche genetische Konstitution hatten, jedoch eine divergente Ausprägung des Verzweigungsphänotyps aufwiesen (Abb. 3-10; blaue Pfeilspitzen).

Die Rekombinationsfrequenz zwischen den äußeren Markern S153 und S176 betrug 14,41cM (Abb. 3-10). Zur weiteren Feinkartierung wurde die Markerdichte in dem bereits eingegrenzten Bereich zwischen 253kb und 331kb erhöht (Abb. 3-11 A). Die genotypische und phänotypische Vergleichsanalyse weiterer Pflanzen schränkte den möglichen Bereich für das verantwortliche Gen weiter ein und identifizierte schließlich einen Abschnitt von ~13kb zwischen den Markern S226 an Position 267kb und S228 an Position 281kb (Abb.

3-11 A). Rekombinationsereignisse zwischen den Markern S226 und S228 waren nur noch mit einer Frequenz von 0,33cM zu finden. Eine der wenigen Rekombinanten in diesem Bereich zeigte ein widersprüchliches Ergebnis und war homozygot für den Ökotyp C24, wohingegen die Seitentriebbildung in Stängelblattachsen dieser Pflanze nicht beeinträchtigt war (Abb. 3-11 A).

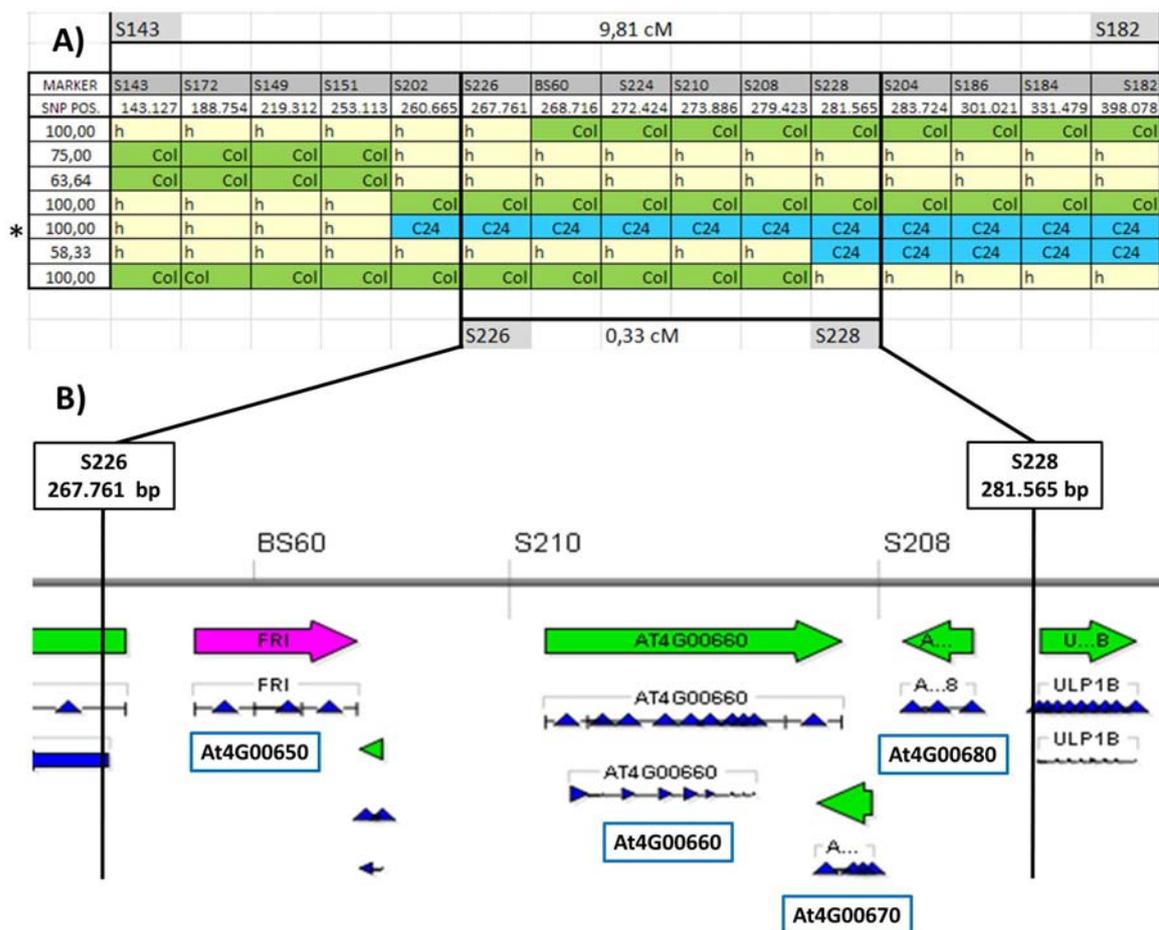


Abb. 3-11: Feinkartierung in rekombinanten Pflanzen der BC3F2 Kartierungspopulation.

(A) Dargestellt sind Rekombinanten (Zeilen), sowie deren genetische Zusammensetzung an verschiedenen Marker-Positionen (Spalten). Durch die Erhöhung der Markerdichte konnte eine Zielregion von ca. 13kb, in dem Bereich von 268kb bis 281kb, mit fünf Zielgenen identifiziert werden. *: Rekombinante Pflanze mit widersprüchlichem Ergebnis. Die Rekombinationsfrequenz zwischen einzelnen Markern ist ober- und unterhalb der Grafik in cM angegeben. Boxen: blau = C24 homozygot, gelb = heterozygot, grün = Columbia homozygot. (B) Darstellung der identifizierten Kandidatengene zwischen 267kb und 281kb im oberen Bereich des kurzen Arms auf Chromosom IV, sowie die in diesem Bereich verwendeten molekularen Marker.

Der identifizierte Zielbereich enthielt nach der Annotation der Datenbank TAIR (Version TAIR10) fünf Gene: At4G00650, At4g00651, At4G00660, At4G00670 und At4G00680 (Abb. 3-11 B).

Das Gen At4G00660 codiert für das Enzym „DEAD-box RNAhelicase-like 8“ (AtRH8), eine RNA Helikase deren Aktivität scheinbar keinen Einfluss auf die pflanzliche Entwicklung hat (Huang *et al.*, 2010). Huang *et al.* konnten zeigen, dass AtRH8 notwendig ist für die Infektion zweier Potyviren, des Plum pox virus (PPV; Virus der Scharka-Krankheit) und des Turnip mosaic virus (TuMV), und dass AtRH8 Proteine in virus-infizierten Blättern akkumulieren, wahrscheinlich als Wirtsfaktoren für die Translation und Replikation des viralen Genoms. Das Gen At4G00670 gehört zur Familie der Remorin-Proteine, einer pflanzenspezifischen Proteinfamilie mit sechs Untergruppen, über deren Funktion relativ wenig bekannt ist (Raffaele *et al.*, 2007). Jarsch und Ott nehmen an, dass Mitglieder dieser Familie eine wichtige Rolle bei der Pflanzenabwehr einnehmen und beteiligt sind an der hormon-vermittelten Signaltransduktion verschiedener biotischer und abiotischer Stressfaktoren (Jarsch and Ott, 2010). Obwohl in vielen Datenbanken Remorin-Proteine als DNA-bindende Faktoren beschrieben sind, gibt es derzeit noch keinen *in vivo* Nachweis darüber (Reymond *et al.*, 1996; Jarsch and Ott, 2010). Das dritte der fünf identifizierten Gene, At4G00680, codiert für das Aktin-bindende Protein „Actin Depolymerizing Factor 8“ (ADF8), und gehört als eines von insgesamt 11 Proteinen zur ADF Familie (Kandasamy *et al.*, 2007). *ADF8* zählt zur Untergruppe der reproduktiven Aktin-bindenden Faktoren und ist spezifisch in Trichoblasten und sich entwickelnden Wurzelhaaren exprimiert (Kandasamy *et al.*, 2007).

Das vielversprechendste Kandidatengen At4G00650 codiert für den Blühzeitpunktregulator *FRIGIDA*. In der Nähe des Gens *FRIGIDA* war ein weiteres Gen annotiert, At4G00651, bestehend aus ~350bp, mit gegenläufiger Orientierung und unbekannter Funktion (Abb. 3-11 B). Die Sequenzierung dieses Gens zeigte keine Sequenzunterschiede in der codierenden Region zwischen den Ökotypen Columbia und C24, allerdings konnten fünf SNP im 3' Bereich von *FRIGIDA* und somit im 5' Bereich von At4G00651 identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). CHIP-Seq Experimente von Deng *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass der MADS-Box Transkriptionsfaktor *FLC* im 3' regulatorischen Bereich von *FRIGIDA* bindet und damit möglicherweise im 5' regulatorischen Bereich von At4G00651 (Deng *et al.*, 2011). Weitere qRT-PCR Experimente in Linien mit funktionellen *FRI* Allelen (*FLC/FRI* in Col-0 vs. *flc-3/FRI* in Col-0) konnten unabhängig von aktiven und inaktiven *FLC* Allelen, keine erhöhte Expression weder von *FRIGIDA*, noch von At4G00651 nachweisen (Deng *et al.*, 2011). Aufgrund der beschriebenen Funktionen wurden die Gene At4g00651, At4G00660, At4G00670 und At4G00680 als mögliche Kandidaten für den verstärkten *las*

Verzweigungsdefekt ausgeschlossen. Das vielversprechendste Kandidatengen der Zielregion war das Gen mit der Identifikationsnummer At4G00650, welches für den dominanten Blühzeitpunktregulator *FRIGIDA* (*FRI*) kodiert.

3.1.6. Der Blühzeitpunktregulator *FRIGIDA* als Kandidatengen

Funktionelle *FRI* Allele sind dominant und führen zu einem späten Blühzeitpunkt (Johanson *et al.*, 2000). Die Ausprägung des spätblühenden Phänotyps ist dabei abhängig von der Präsenz funktioneller Allele des MADS-Box Transkriptionsfaktor *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) (Koornneef *et al.*, 2004; Johanson *et al.*, 2000). Studien haben gezeigt, dass *FRIGIDA* mit vier weiteren Proteinen den sogenannten *FRI-C* Komplex bildet, welcher während der vegetativen Entwicklung positiv die Expression des MADS-Box Transkriptionsfaktor *FLC* reguliert (Choi *et al.*, 2011; Geraldo *et al.*, 2009; Michaels, 2009). Das *FLC* Protein hingegen interagiert mit dem MADS-Box Transkriptionsfaktor *SVP* und verhindert die Expression der „*floral integrator genes*“ *FT*, *SOC1* und *FD* (Searle *et al.*, 2006; Michaels, 2009; Jarillo and Pineiro, 2011). Diese Reprimierung unterdrückt während der vegetativen Phase die Transition des vegetativen Sprossapikalmeristems zum Infloreszenzmeristem durch fehlende Aktivierung der Blütenmeristem-Identitätsgene *LFY*, *CAL*, *FUL*, *API* und *AP2* (Koornneef *et al.*, 1998; Searle *et al.*, 2006; Michaels 2009; Kaufmann *et al.*, 2010; Irish, 2010). Nach der Blühinduktion sinkt die Expression der MADS-Box Transkriptionsfaktoren *FLC* und *SVP*, und mRNA-Transkripte sind nicht länger im SAM nachweisbar (Michaels and Amasino, 1999; Hartmann *et al.*, 2000; Searle *et al.*, 2006). Aufgrund der fehlenden Repression durch *FLC* und *SVP* steigt die Expression der Gene *SOC1* und *FT*, die wiederum durch Aktivierung der Blütenmeristem-Identitätsgene positiv die Blühinduktion vermitteln (Koornneef *et al.*, 1998; Searle *et al.*, 2006; Michaels, 2009). Die genetische Regulation von *FRIGIDA* ist unklar, allerdings kann der durch *FRI* und *FLC* vermittelte, blühzeitpunktverzögernde Effekt durch Vernalisation unterdrückt werden (Srikanth and Schmid, 2011; Geraldo *et al.*, 2009).

Zur Überprüfung der Funktionalität der endogenen *FRIGIDA* Allele in den Ökotypen Kyo und C24, wurde eine Sequenzanalyse mit anschließendem Alignment der Aminosäuresequenz durchgeführt.

3.1.7. Allele der Blühzeitpunktregulatoren *FRIGIDA* und *FLC* in Columbia und C24

Zur Sequenzierung der endogenen *FRI* Allele in den Ökotypen Kyo und C24, wurde als Referenz die Linie *FRI* (SF-2) in Col-0 hinzugefügt. Die *FRI* Linie im Ökotyp Columbia trägt ein funktionelles *FRI* Allel aus dem Ökotyp San Feliu 2 (SF-2) und Pflanzen dieser Linie sind durch die Interaktion der beiden funktionellen Loci *FRI* und *FLC* extrem spätblühend und reagieren sensitiv auf Vernalisation (Michaels and Amasino, 1999; Michaels *et al.*, 2005). Bei der Sequenzierung (Tab. 3-3) der verschiedenen Allele konnten in der kodierenden Region im ersten Exon insgesamt sechs SNP und eine 16bp Deletion identifiziert werden. Zusätzlich konnten insgesamt sechs weitere Nukleotidpolymorphismen im 5' und 3' regulatorischen Bereich, sowie eine Triplet-Insertion im 5' Promotorbereich des Ökotyp Kyoto ermittelt werden. Das einzige Intron des *FRIGIDA* Gens wies ebenfalls einen SNP im SF-2 Allel auf (Tab. 3-3).

Region		5' Promotor Bereich			Kodierender Bereich						IR	3' Promotor Bereich				
bp Position		-409	-176	-113	+48	+84	+155	+437	+444*	+501	+937	+1247	+1382	+1789	+1837	+2080
Ökotyp	Col	G	C	-	G	A	A	A	A	T	-16bp	A	A	C	A	T
	C24	G	C	-	G	C	A	A	G	T	-	A	A	C	G	T
	SF-2	C	T	-	G	A	A	G	G	T	-	G	G	C	G	C
	Kyo	G	T	+3bp	A	A	C	G	G	A	-	A	G	T	G	C

Tab. 3-3: Sequenzierung der *FRIGIDA* Allele in verschiedenen Linien.

Für die Sequenzierung diente DNA der Ökotypen C24, Kyo und Col-0. Als Referenz wurde die Linie *FRI* in Col-0 verwendet, die ein funktionelles *FRI* Allel aus dem Ökotyp SF-2 trägt. Der sequenzierte Bereich umfasste die Basenpaare -500 im 5' Promotorbereich bis +2100bp nach dem ATG im 3' Promotorbereich. Die bp Position gibt die Positionen der SNP relativ zum ATG an. *: der Austausch der Base Guanin zu Adenin führt zum Verlust einer BsmFI Restriktionsschnittstelle und zum Austausch der Aminosäure Methionin zu Isoleucin. IR = Intron.

Sequenzstudien von Johanson *et al.* ermöglichten die Einteilung von ca. 40 verschiedenen Ökotypen in fünf Gruppen bezüglich ihrer Polymorphismen am Locus *FRIGIDA*, wobei die Wildtypen C24 und Kyoto nicht inbegriffen waren. Die erste Gruppe beinhaltete frühblühende Ökotypen wie Columbia, mit der 16bp Deletion im kodierenden Bereich, sowie dem Austausch der Aminosäure Glycin zu Glutaminsäure an Position 146 des Proteins (Abb. 3-12 B). Die 16bp Deletion führt im *FRIGIDA* Protein zu einer

Verschiebung des Leserasters, wodurch ein verkürztes, nicht funktionelles Protein mit einer Länge von 318 Aminosäuren gebildet wird (Abb. 3-12 A und B). In der dritten Gruppe wurden spätblühende Ökotypen zusammengefasst wie San Feliu-2 (SF-2), die keine 16bp Deletion aufweisen und an Position 146 im Protein die Aminosäure Glycin tragen (Abb. 3-12 A und B). Die Sequenzierung des *FRI* Allels aus Kyoto und Literaturrecherchen zu dem Kyoto *FLC* Allel ermöglichten die Einteilung in die nach Johanson *et al.* definierte fünfte Gruppe, zu der auch das *FRIGIDA* Allel aus Shahdara zählte (Abb. 3-12 A und B; Shibaïke *et al.*, 1999; Johanson *et al.*, 2000). Pflanzen dieser Gruppe tragen funktionelle *FRI* Allele und sind von der genetischen Konstitution am *FRI* Locus mit Pflanzen der dritten Gruppe wie SF-2 vergleichbar, zeigen aber aufgrund ihrer rezessiven *FLC* Allele einen frühblühenden Phänotyp (Johanson *et al.*, 2000).

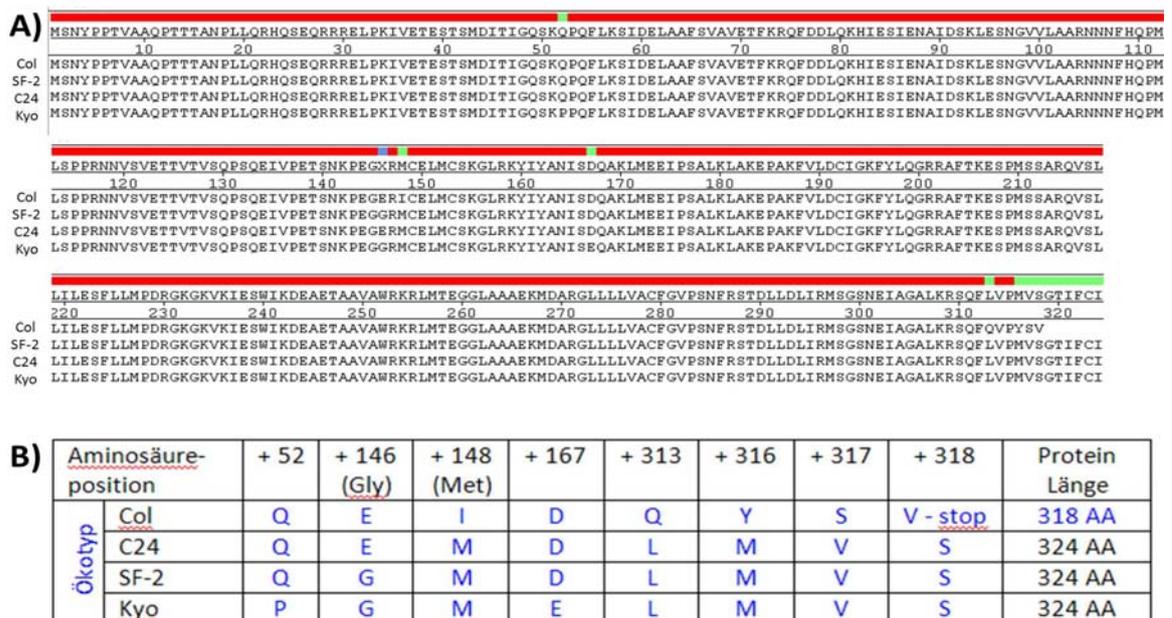


Abb. 3-12: Alignment der Aminosäure Sequenz des Proteins FRIGIDA verschiedener Ökotypen.

(A) Alignment der Aminosäure-Sequenz des Proteins FRIGIDA der Linien Col-0, *FRI* (SF-2) in Col-0, C24 und Kyo. Die Positionen der Aminosäuren im Protein sind oberhalb der Sequenz angegeben. (B) Übersicht der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung des Proteins FRIGIDA in den Linien Col-0, C24, *FRI* (SF-2) in Col-0 und Kyo. Die Positionen der Aminosäuresubstitutionen sind angegeben. Gly = Glycin; Met = Methionin. Der Austausch von Methionin zu Isoleucin bedingt den Verlust einer BsmFI Restriktionsschnittstelle. Daten basieren auf der Sequenzierung der einzelnen Linien.

Die Sequenzierung des Ökotyp C24 hingegen ließ keine Einteilung in eine der fünf Gruppen zu. Der Ökotyp C24 besitzt am *FRI* Locus keine 16bp Deletion im kodierenden Bereich und trägt an der Position 146 im Protein die Aminosäure Glutaminsäure. C24-Pflanzen waren genetisch am ehesten mit Ökotypen der Gruppe vier vergleichbar, wobei alle Ökotypen dieser Gruppe einen spätblühenden Phänotyp aufweisen (Johanson *et al.*, 2000). Pflanzen des Ökotyp C24 werden in der Literatur als frühblühend beschrieben, wobei sie einen späteren Blühzeitpunkt aufweisen als Pflanzen der Wildtypen Columbia oder Landsberg *erecta* (Abb. 3-13; Sanda and Amasino, 1995). Sanda und Amasino konnten jedoch durch Kreuzungen von C24 mit Columbia nachweisen, dass das *FRI* Allel aus C24 funktionell ist und in Kreuzungsnachkommen eine späte Blühinduktion vermittelt (Sanda and Amasino, 1995). Damit würde der Ökotyp C24 eine vollständig neue Gruppe bilden, die nachweist, dass die Aminosäure Glycin an Position 146 des Proteins nicht ausschlaggebend ist für die Funktionalität des Proteins. Die genetische Konstitution der *FRI* und *FLC* Allele aller verwendeten Linien, sowie deren phänotypische Ausprägung ist in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Die einzigen in dieser Arbeit verwendeten Ökotypen mit funktionellen *FRI* Allelen waren Pflanzen der Linien Shahdara, Kyoto und C24.

In den Kreuzungspopulationen der *las* Mutante mit den Ökotypen Kyo und C24 korrelierte der beobachtete Verzweigungsdefekt mit einem späten Blühzeitpunkt der Pflanzen (Kapitel 3.1.2). Frühblühende Nachkommen wiesen stets eine normale Seitentriebbildung in Blattachsen des Haupttriebs auf (Kapitel 3.1.2). Genetische Studien zeigten, dass die FRIGIDA-vermittelte späte Blühinduktion von der Funktionalität des MADS-Box Transkriptionsfaktors FLC abhängig ist (Koornneef *et al.*, 2004; Johanson *et al.*, 2000). Die *FLC* Allele des Ökotyp Columbia sind funktionell, vermitteln aber durch das nicht funktionelle *FRI* Protein einen frühblühenden Phänotyp (Michaels and Amasino, 1999; Johanson *et al.*, 2000). Die Linie *FRI* in Col-0 hingegen, in die durch achtmalige Rückkreuzung das funktionelle *FRI* Allel des Ökotyp San Feliu 2 (SF-2) eingebracht wurde, ist durch die Interaktion der beiden funktionellen Allele *FRI* und *FLC* extrem spätblühend (Michaels and Amasino, 1999; Michaels *et al.*, 2005).

Der Ökotyp C24 trägt im Gegensatz zu dem Wildtyp Columbia ein funktionelles *FRI* Allel (Sanda and Amasino, 1995). Der frühblühende C24-Phänotyp, sowie Kreuzungen dieses Ökotyp zu verschiedenen Linien mit funktionellen und nicht funktionellen *FLC* Allelen lassen vermuten, dass C24 ein schwaches oder inaktives *FLC* Allel trägt (Sanda and Amasino, 1995; Gazzani *et al.*, 2003). Sequenzanalysen zeigten, dass trotz der frühen

Blühinduktion, die Nukleotidsequenz der kodierenden Region des *FLC* Allels in den Ökotypen C24 und Col-0 identisch ist (Sanda and Amasino, 1995; Sheldon *et al.*, 2000). Sheldon *et al.* vermuteten, dass die Unterschiede der *FLC* Aktivität durch eine divergente Regulation der Expression, möglicherweise durch Sequenzpolymorphismen im Promotorbereich, zustande kommt. In weiteren Analysen konnten zwischen den beiden Ökotypen Nukleotidpolymorphismen im Promotor- und Intronbereich identifizieren werden, wobei es allerdings nicht möglich war eine Korrelation zwischen einem der Polymorphismen und der beobachteten *FLC*-Aktivität nachzuweisen (Gazzani *et al.*, 2003).



Abb. 3-13: Unterschiede im Blühzeitpunkt zwischen der *las*-Mutante und den Ökotypen Columbia, C24 und der *FRI* Linie im Columbia Hintergrund.

Von links nach rechts: C24, Col-0, *FRI* in Col-0, *las* Mutante. Der Wildtyp Col-0 und die *las* Mutante im Col-0 Hintergrund sind frühblühend, während der Ökotyp C24 eine leicht spätere Blüte zeigt und noch keine Schoten am Haupttrieb zu erkennen sind. Die *FRI* Linie im Col-0 Hintergrund ist extrem spätblühend und zeigte zum Zeitpunkt der Fotoaufnahmen noch keinen Stängel. Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen.

Salomé *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass das *FLC* Allel aus C24 möglicherweise doch nicht rezessiv ist. So wurden in einer F₂-Population der Kreuzung C24 zur *flc-3*-Mutante, einer *loss-of-function*-Mutante im Columbia Hintergrund, Pflanzen nachgewiesen, bei denen der spätblühende Phänotyp mit dem *FLC* Allel aus C24 kosegregierte (Salomé *et al.*, 2011). Die Autoren nahmen an, dass der Ökotyp C24 ein funktionelles *FLC* Allel trägt, dessen Ausprägung jedoch durch einen zusätzlichen, genetischen Faktor verhindert wird (Salomé *et al.*, 2011).

Zur Überprüfung in wie weit der in der Kreuzungspopulation *las*/C24 beobachtete Verzweigungsdefekt abhängig ist von dem dominanten Blühzeitpunktregulator *FRIGIDA*, wurde die *las* Mutante im Hintergrund Columbia mit der Linie *FRI* in Col-0 (SF-2) gekreuzt.

Ökotyp	<i>FRIGIDA</i>	<i>FLC</i>	Phänotyp	Referenz
Col-0	inaktiv	aktiv	frühblühend	Johanson <i>et al.</i> , 2000; Koorneef <i>et al.</i> , 2004
<i>FRI</i> (SF-2) in Col-0	aktiv	aktiv	spätblühend	Johanson <i>et al.</i> , 2000; Shibaïke <i>et al.</i> , 1999
C24	aktiv	schwaches Allel	frühblühend, aber leicht später als Col-0	Sanda and Amasino 1995; Salomé <i>et al.</i> , 2011; Gazzani <i>et al.</i> , 2003; Shibaïke <i>et al.</i> , 1999
Kyo	aktiv	schwaches Allel	frühblühend, aber leicht später als Col-0	Shibaïke <i>et al.</i> , 1999
Sha	aktiv	inaktiv	frühblühend	Johanson <i>et al.</i> , 2000; Gazzani <i>et al.</i> , 2003
Eri	nicht bekannt	aktiv	frühblühend	Xueqing. Huang (Persönliche Mitteilung)
An-1	inaktiv	inaktiv	frühblühend	Caicedo <i>et al.</i> , 2004; Xueqing. Huang (Persönliche Mitteilung)
Cvi	inaktiv	aktiv	frühblühend	Johanson <i>et al.</i> , 2000; Gazzani <i>et al.</i> , 2003

Tab. 3-4: Genetische Konstitution der Loci *FRIGIDA* und *FLC* in den verwendeten Ökotypen, sowie der aus der Interaktion von *FRI* und *FLC* resultierende Blühzeitpunktphänotyp.

3.2. Analysen zur Interaktion zwischen Verzweigungs- und Blühzeitpunktregulatoren

In der bestehenden Literatur wird die Ausprägung einiger Verzweigungsdefekte in Abhängigkeit einer verlängerten vegetativen Entwicklungsphase der Pflanzen durch Wachstum in kurzen Photoperioden beschrieben (Müller *et al.*, 2006; Yang, 2007; Raatz, 2009). Vergleichend zeigen besonders die *rax* Dreifachmutante und die *las-4 eol5* Doppelmutante eine ähnliche Korrelation, wie Pflanzen der Population *las/C24*, zwischen einer langen vegetativen Entwicklungsphase der Pflanzen und einem Seitentriebdefekt in Blattachsen des Haupttriebs. Um den möglichen Einfluss weiterer Blühzeitpunktregulatoren wie *FRIGIDA* auf die Anlage von Lateralmeristemen zu überprüfen, wurde die *las* Einzelmutante, sowie die *las rax1-3* Doppelmutante zusätzlich mit zwei weiteren Blühzeitpunktmutanten gekreuzt, deren zugehörige Gene an unterschiedlichen Positionen im Stoffwechselweg agieren. Die homozygoten Nachkommen aller Kreuzungen wurden phänotypisch auf die Anlage axillärer Meristeme in Stängelblattachsen untersucht.

3.2.1. Phänotypische Analyse von Doppel- und Dreifachmutanten

3.2.1.1. Phänotypische Charakterisierung der Linien *las FRI* und *las rax1 FRI*

Die Feinkartierung des verstärkten *las* Verzweigungsdefekts in der Kreuzungspopulation *las/C24* identifizierte als möglichen, verantwortlichen Locus den dominanten Blühzeitpunktregulator *FRIGIDA* aus dem Ökotyp C24. Funktionelle *FRI* Allele sind dominant und führen zu einem späten Blühzeitpunkt (Johanson *et al.*, 2000). Studien haben nachgewiesen, dass *FRI* die genetische Aktivität von *FLC* während der vegetativen Entwicklungsphase positiv reguliert, wodurch es indirekt zu einer starken Verzögerung des Blühzeitpunktes kommt (Michaels and Amasino, 1999; Johanson *et al.*, 2000; Geraldo *et al.*, 2009). Um den Einfluss des *FRIGIDA* Gens auf die Anlage von Lateralmeristemen zu prüfen, wurde die *las* Mutante mit der Linie *FRI* (SF-2) in Col-0 gekreuzt. Die *las* Mutante im Ökotyp Columbia ist bezüglich des Gens *FRIGIDA* eine Doppelmutante, da das *fri* Allel aus Columbia durch eine natürlich vorkommende 16bp Deletion in der kodierenden Region zu einem verkürzten und inaktiven Protein führt. F2-Kreuzungsnachkommen die Homozygotie für das mutante *las-4* Allel, sowie für das funktionelle *FRI* Allel aus dem Ökotyp SF-2 zeigten, werden zur Vereinfachung als „*las FRI*“ Pflanzen bezeichnet.

Ebenso wird die Linie *FRI* in Col-0 mit dem aktiven Allel aus SF-2 fortan als „*FRI*“ bezeichnet.

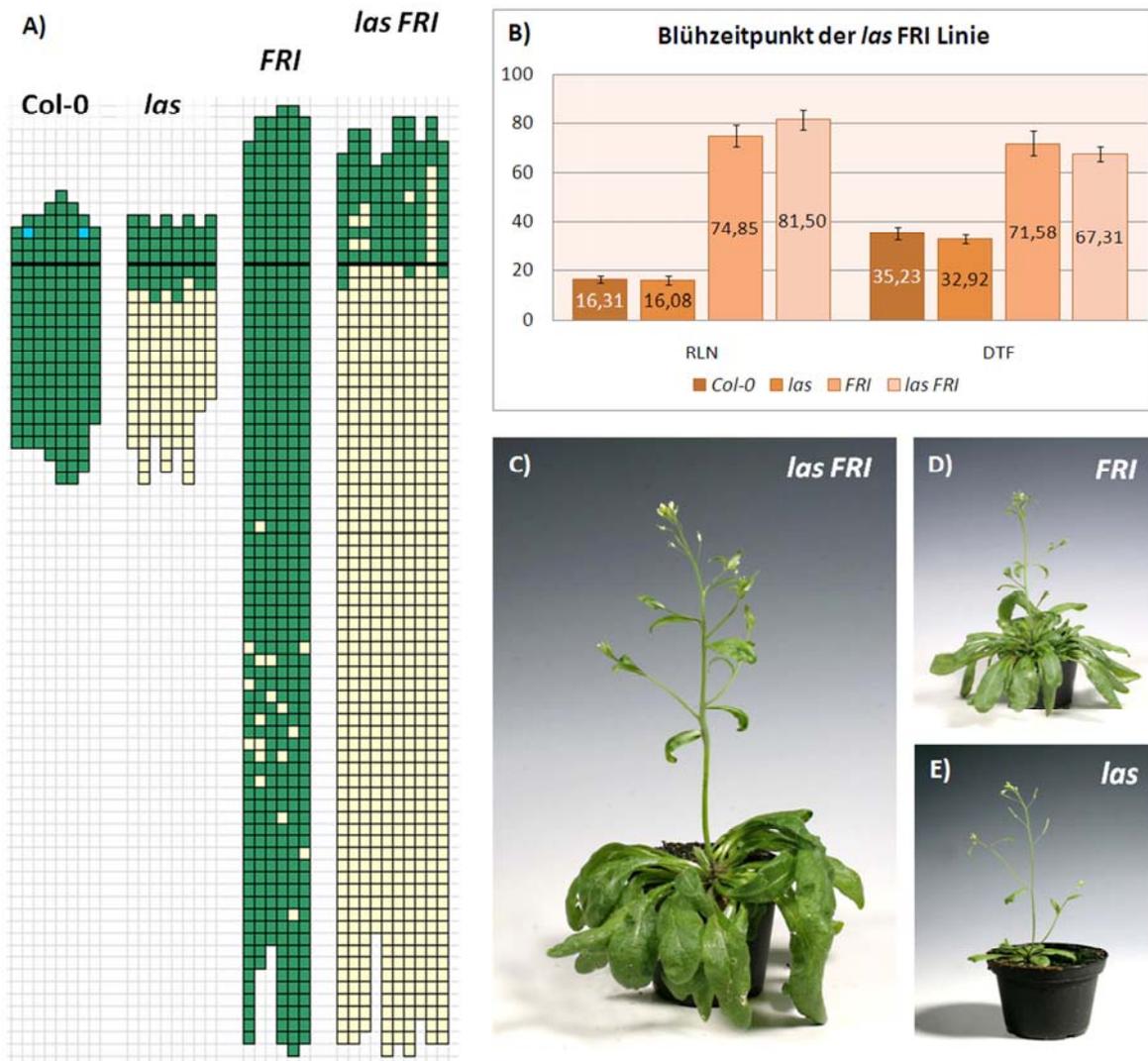


Abb. 3-14: Phänotyp der Linie *las FRI* unter Langtagbedingungen.

(A) Seitentriebbildung in *las FRI* Pflanzen. Farben: grün = Knospe/ Seitentrieb; gelb = Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs; blau = akessorische Knospe. (B) Blühzeitpunkt in Pflanzen der Linie *las FRI*. RLN = Rosettenblätter bis zur Blüte. DTF = Tage bis zur Blüte. Pflanzen wuchsen im Monat Januar unter Gewächshausbedingungen. Vertikale Fehlerindikatoren: Standardabweichung. (C) Habitus einer *las FRI* Pflanze. (D) Habitus einer Pflanze der Linie *FRI* (Col-0). (E) Habitus der *las* Mutante (Col-0). Alle Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen.

Die phänotypische Charakterisierung der Seitentriebentwicklung in Pflanzen der Linie *FRI* identifizierte keinen Defekt in der Anlage von Lateralmeristemen unter Langtagbedingungen (Abb. 3-14 A und D). In einigen der älteren Rosettenblattachsen war die Seitentriebbildung im Vergleich zu dem Ökotyp Columbia unterdrückt, allerdings konnte dieses Ergebnis in weiteren Experimenten nicht reproduziert werden (Abb. 3-14 A).

Durch den spätblühenden Phänotyp der *FRI* Linie war die Auswertung der ältesten Rosettenblattachsen nicht möglich, da die ältesten Rosettenblätter während der Blüte, zum Zeitpunkt der Analyse, bereits häufig schon verrotten waren. Daher spiegelt die in Abb. 3-14 (A) angegebene Rosettenblattanzahl der *FRI* und der *las FRI* Pflanzen nicht die vollständige Blattanzahl der Rosette wider. Die zusätzliche Analyse der Seitentriebentwicklung vor der Blüte in Pflanzen der Linie *FRI*, ließ unter Langtagbedingungen keinen Defekt, weder in den ältesten, noch in jüngeren Rosettenblattachsen erkennen (Daten nicht gezeigt). Homozygote Nachkommen der Linie *las FRI* zeigten wie die elterliche *las* Mutante eine nahezu vollständige Unterdrückung der Seitentriebabildung während der vegetativen Entwicklung der Pflanzen (Abb. 3-14 A, C und E). Bei der Analyse der Blattachsen am Haupttrieb von *las FRI* Pflanzen war bei einigen Individuen die Bildung von Lateralmeristemen in manchen Blattachsen unterdrückt (Abb. 3-14 A). Bei zweimaliger Wiederholung dieses Experiments, konnte dieses Ergebnis einmal bestätigt werden, wohingegen die Auswertung der zweiten Population keinen Seitentriebabdefekt erkennen ließ (Daten nicht gezeigt).

Die Interaktion der beiden Loci *FRI* und *FLC* in Individuen der Linie *FRI* und *las FRI* führte zu einem stark verzögerten Blühzeitpunkt, wodurch die Anzahl an Stängelblättern in beiden Linien erhöht war (Abb. 3-14 A und B). Im Wachstumsmonat Januar blühten Pflanzen des Ökotyps Columbia und der *las* Mutante nahezu gleich früh nach der Bildung von 16,3 ($\pm 1,32$) und 16,1 ($\pm 1,82$) Rosettenblättern (Abb. 3-14 B). Pflanzen der Linien *FRI* und *las FRI* waren extrem spätblühend und benötigten die Bildung von 74,8 ($\pm 4,5$) und 81,5 ($\pm 4,18$) Rosettenblättern bis zur Blühinduktion. Das Verhältnis der Rosettenblattanzahl bis zur Blüte zwischen den einzelnen Linien war vergleichbar mit der Anzahl an Tagen bis zur Blüte und *las FRI*, sowie *FRI* Pflanzen benötigten ungefähr doppelt so lange zur Blühinduktion als Pflanzen der Kontrollpopulationen (Abb. 3-14 B). Die beim Verzweigungsdefekt in Stängelblattachsen zu beobachtende phänotypische Variabilität von *las FRI* Individuen konnte auch beim Blühzeitpunkt beobachtet werden. So bildeten *las* Einzelmutanten die im Monat April im Gewächshaus unter Langtagbedingungen angezogen wurden durchschnittlich 13,2 ($\pm 0,94$) Rosettenblätter bis zur Blüte, wohingegen Pflanzen der Linie *las FRI* ca. 59,1 ($\pm 3,64$) Rosettenblätter anlegten (Daten nicht gezeigt). Die Differenz in der Anzahl von Rosettenblättern bis zur Blüte, die bei Experimenten zu unterschiedlichen Jahreszeiten in *las* Einzelmutanten und Individuen der Linie *las FRI* ermittelt werden konnte, war im Verhältnis zueinander vergleichbar. Pflanzen der

Doppelmutanten *las FRI* bildeten unter Gewächshausbedingungen im Januar fünfmal so viele Rosettenblätter als *las* Mutanten, wohingegen Pflanzen des Wachstumsmonat April vereinhalmal so viele Rosettenblätter bis zur Blüte formten als *las* Mutanten. Es wurde vermutet, dass der steigende Anteil des natürlichen Tageslichts im Frühjahr trotz kontrollierter Gewächshausbedingungen einen starken Einfluss sowohl auf den Blühzeitpunkt-, als auch auf den Verzweigungsphänotyp hat.

	<i>fri/fri</i>	<i>fri/FRI</i>	<i>FRI/FRI</i>
Mutanten-Bulk (<25% Seitentriebe)	--	63,33 %	36,66 %
Wt-Bulk (>75% Seitentriebe)	85 %	6,66 %	8,33 %

Tab. 3-5: Segregation am Locus *FRIGIDA* in Bulks der BC1F2-Kartierungspopulation.

Dargestellt sind die Segregationsverhältnisse am Locus *FRIGIDA* in den zur Grobkartierung verwendeten Mutanten- und Wt-Bulks. Die Segregationsergebnisse sind angegeben als prozentuale Anteile der Pflanzen zur verwendeten Bulk-Gesamtpopulation. *fri*: inaktives *fri* Allel aus dem Ökotyp Columbia; *FRI*: aktives *FRI* Allel aus dem Ökotyp C24.

Die Feinkartierung des verstärkten *las* Verzweigungsdefekts identifizierte als möglichen Kandidaten das aktive *FRI* Allel aus dem Ökotyp C24. Die Analyse der Seitentriebbildung in Pflanzen der Linie *las FRI* ließ in wenigen Individuen eine leichte Abweichung des *las* Verzweigungsmusters erkennen (Abb. 3-14 A). Zur Überprüfung einer Kosegregation des beobachteten Seitentriebdefekts mit dem *FRI* Locus wurde eine Marker-Analyse der BC1F2-Pflanzen durchgeführt die für die Bildung der Mutanten- und Wt-Bulks zur Grobkartierung verwendet wurden (Tab. 3-5). Die Marker-Analyse ergab, dass ~64% der Pflanzen die für den Mutanten-Bulk verwendet wurden und weniger als 25% Seitentriebe in Stängelblattachsen bildeten, heterozygot für das aktive *FRI*-Allel aus C24 waren und ~37% der Pflanzen Homozygotie für *FRI* zeigten. Dagegen waren 85% der *las*-ähnlichen Pflanzen die für den Wt-Bulk verwendet wurden, homozygot für das inaktive *fri* Allel aus dem Ökotyp Columbia. Zusätzlich traten ~15% Pflanzen auf, die mindestens ein funktionelles *FRI* Allel aus C24 trugen, jedoch kein von *las* abweichendes Verzweigungsmuster aufwiesen. Somit konnte die Marker-Analyse eine starke Tendenz, aber keine 100%ige Kosegregation zwischen dem *las* Enhancer-Phänotyp und dem *FRI*-Allel aus C24 nachweisen.

Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion wurde für weitere Experimente die *las rax1* Doppelmutante mit der *FRI* Linie gekreuzt. Genetische Studien der *rax1*, *rax2* und *rax3* Mutanten konnten aufdecken, dass die *RAX* Gene redundant wirken und die Anlage axillärer Meristeme durch überlappende Funktion entlang der Sprossachse während der vegetativen, als auch der frühen reproduktiven Entwicklung der Pflanze kontrollieren (Müller *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2006). Müller *et al.* konnten zeigen, dass das Gen *RAX1* hierbei den größten Einfluss besitzt und *rax1* Mutanten außerdem in der Lage sind, den *las* Verzweigungsdefekt unter Kurztagbedingungen zu verstärken. Die Autoren zeigten, dass die *RAX* Gene und *LAS* die Initiation axillärer Meristeme durch zwei, partiell redundante Stoffwechselwege regulieren.

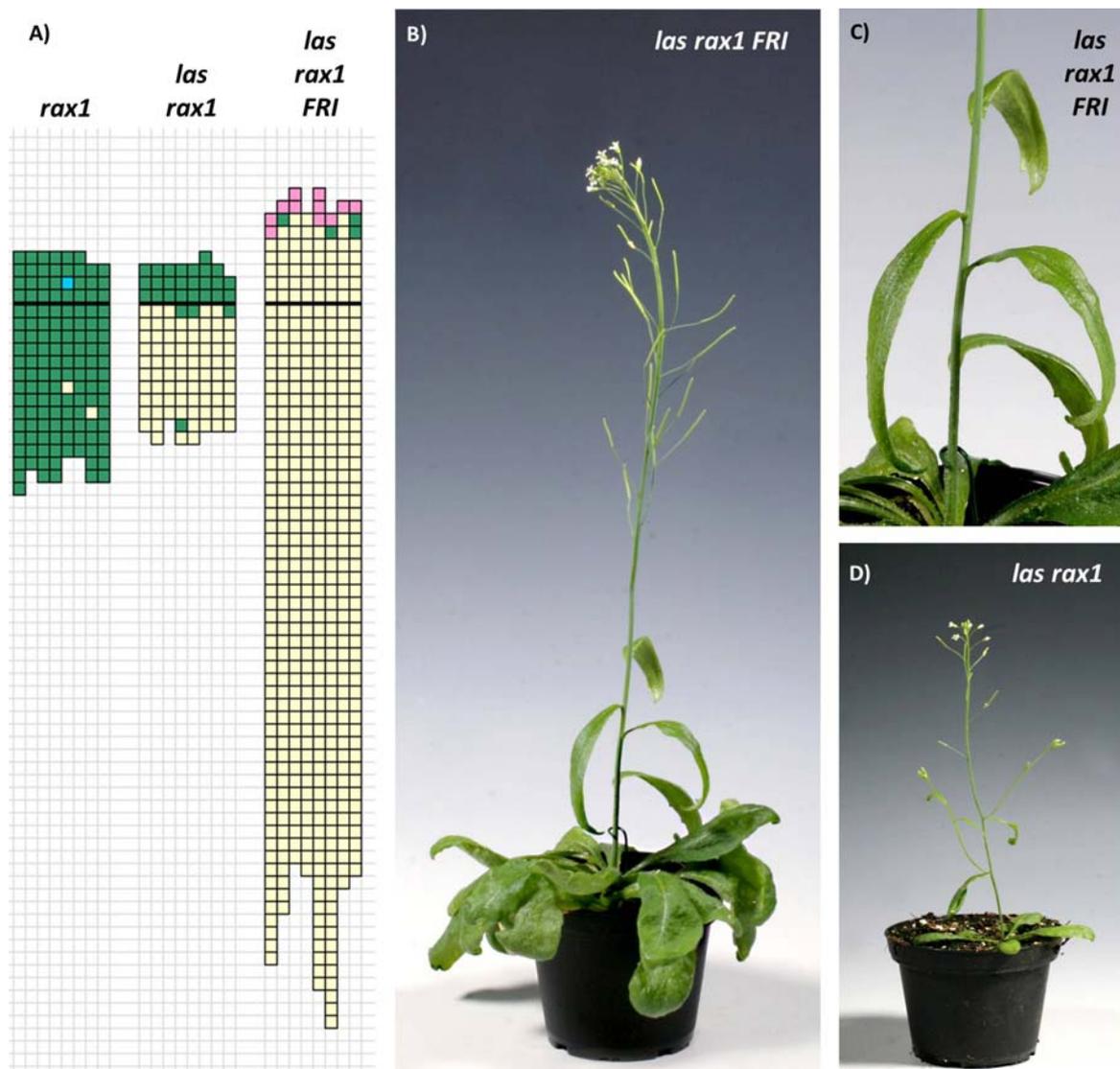


Abb. 3-15: Phänotyp der Linie *las rax1 FRI* unter Langtagbedingungen.

(A) Seitentriebbildung in Pflanzen der Linie *las rax1 FRI*. Farben: grün = Knospe/ Seitentrieb; gelb = Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs; blau = akzessorische Knospe; rosa = Blüte anstelle eines Seitentriebs. (B) Habitus einer *las rax1 FRI* Pflanze. (C) Stängelausschnitt der *las rax1 FRI* Pflanze aus (B). Die Anlage axillärer Meristeme in Stängelblattachseln ist nahezu vollständig unterdrückt. (D) Habitus einer *las rax1* Doppelmutante (Col-0). Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen.

Der für kurze Photoperioden beschriebene *rax1* Seitentriebdefekt während der frühen vegetativen Entwicklung in Rosettenblattachseln, ist in Langtagbedingungen nicht sichtbar und auch *las rax1* Doppelmutanten weisen in langen Photoperioden keine Verstärkung, sondern ausschließlich den *las* vermittelten Verzweigungsdefekt in Rosettenblattachseln auf (Abb. 3-15 A und D). Die Kombination der Doppelmutante *las rax1* mit dem aktiven *FRI* Allel aus dem Ökotyp SF-2, führte in *las rax1 FRI* Pflanzen zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Anlage axillärer Meristeme in Rosetten- und Stängelblattachseln (Abb. 3-15 A, B und C). Die wenigen in Stängelblattachseln angelegten Meristeme in *las rax1 FRI* Pflanzen zeigten eine veränderte Meristemidentität und bildeten häufig Blüten anstelle reproduktiver Seitentriebe (Abb. 3-15 A). Dieser Phänotyp wurde bereits für *las rax1* Doppelmutanten unter Kurztagbedingungen beschrieben und zeigt, dass *LAS* und *RAX1* nicht nur für die Initiation von Lateralmeristemen, sondern auch für die Identität dieser axillären Meristeme entlang der Sprossachse zuständig sind (Müller *et al.*, 2006). Zusätzlich zu dem beobachteten Seitentriebdefekt wurde der für die *las rax1* Doppelmutante beschriebene frühblühende Phänotyp durch *FRIGIDA* aufgehoben und homozygote *las rax1 FRI* Individuen waren extrem spätblühend (Daten nicht gezeigt), vergleichbar mit Pflanzen der Linie *las FRI* (Abb. 3-14 B).

3.2.1.2. Phänotypische Charakterisierung von *las co* und *las rax1 co* Mutanten

Für dieses Experiment wurde die *las* Einzel-, sowie die *las rax1* Doppelmutante mit der *knock-out* Mutante *constans (co)* gekreuzt. Das Gen *CONSTANS* codiert für einen B-Box Transkriptionsfaktor aus dem tageslängenabhängigen Stoffwechselweg und fördert die Blühinduktion in Abhängigkeit des Tagesrhythmus der Pflanze, sowie der Tageslänge durch Aktivierung der Gene *FT* und *TSF* (Jarillo and Pineiro, 2011; Srikanth and Schmid, 2011; Imaizumi, 2011). Das *CONSTANS* Protein ist ausschließlich unter Langtagbedingungen stabil und *knock-out* Mutanten zeigen nur in langen, nicht jedoch in kurzen Photoperioden, einen spätblühenden Phänotyp (Simpson and Dean, 2002; Jarillo and Pineiro, 2011).

Mutationen im Gen *CONSTANS* und aktive Allele des Blühzeitpunktregulators *FRIGIDA* haben somit im Stoffwechselweg zur Blühinduktion einen Einfluss auf die gleichen genetischen Mechanismen und führen zu einer fehlenden Aktivierung der *floral integrator* Gene *FT*, *SOC1* und *FD*, wodurch die Blühinduktion verzögert wird. Es wurde erwartet, dass Kreuzungsnachkommen der Doppelmutante *las rax1* mit *co* nur dann ein von *las* abweichendes Verzweigungsmuster aufweisen, wenn *FRIGIDA* einen indirekten Einfluss auf die Anlage axillärer Meristeme besitzt, und dadurch die gleichen genetischen Faktoren wie in *las rax1 co* Dreifachmutanten betroffen wären. Im Falle einer direkten Interaktion zwischen *FRIGIDA* und einem Regulator zur Anlage axillärer Meristeme während der reproduktiven Entwicklung, sollten Pflanzen der *las rax1 co* Dreifachmutante keinen vom *las* Phänotyp abweichenden Seitentriebdefekt aufweisen.

Die phänotypische Analyse der Seitentriebbildung in *co* Einzelmutanten und *las co* Doppelmutanten zeigte keinen Defekt in der Anlage von Lateralmeristemen unter Langtagbedingungen (Abb. 3-16 A, B und C). Der Seitentriebdefekt von *las* während der vegetativen Entwicklung war epistatisch über *constans* und *las co* Doppelmutanten bildeten keine Seitentriebe aus Rosettenblattachsen (Abb. 3-16 A). In einzelnen Blattachsen am Haupttrieb von *las co* Pflanzen war die Anlage von Lateralmeristemen, wie auch in Pflanzen der *las FRI* Linie, unterdrückt. Diese Variabilität des Verzweigungsdefekts zeigte sich ebenfalls bei Wiederholungsexperimenten. Dabei wiesen Doppelmutanten in langen Photoperioden unter Gewächshausbedingungen einen Seitentriebdefekt in Abhängigkeit vom Wachstumsmonat während der reproduktiven Entwicklung der Pflanzen auf (Abb. 3-16 D). Wie bereits in Pflanzen der Linie *las FRI*, förderte der längere Anteil natürlichen Tageslichts im Wachstumsmonat April den Defekt in Stängelblattachsen von *las* Einzel- und *las co* Doppelmutanten (Abb. 3-16 D). Im Vergleich zu *las* Einzelmutanten reagierten hierbei *las co* Pflanzen empfindlicher und bildeten weniger Seitentriebe aus Stängelblattachsen.

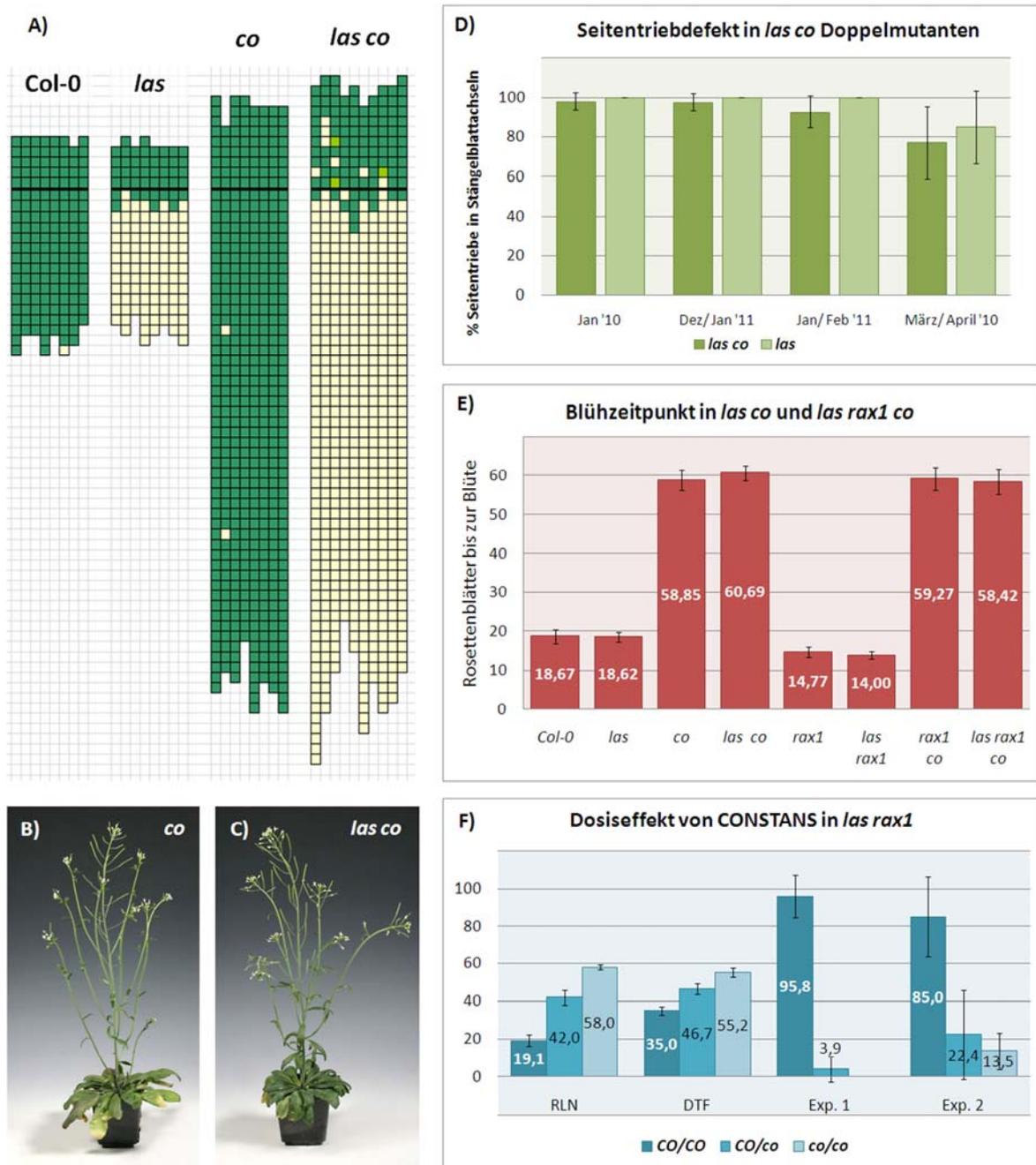


Abb. 3-16: Phänotyp der *las co* Doppelmutante unter Langtagbedingungen.

(A) Seitentriebbildung in *las co* Doppelmutanten. Die angegebene Anzahl an Rosettenblättern in *co* und *las co* Mutanten spiegelt nicht die vollständige Blattzahl wider (siehe 3.2.1.1.). Farben: grün = Knospe/ Seitentrieb; gelb = Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs; hellgrün = Blatt anstelle eines Seitentriebs. (B) Habitus einer *co* Mutante (*Col-0*). (C) Habitus einer *las co* Doppelmutante. (D) Variation der Seitentriebbildung in *las co* Doppelmutanten unter Gewächshausbedingungen in Abhängigkeit vom Wachstumsmonat. (E) Blühzeitpunkt in *las co* Doppelmutanten. Pflanzen wuchsen im Monat Januar unter Gewächshausbedingungen. (F) Dosisseffekt von *CONSTANS* auf unterschiedliche Merkmale in homozygoten *las rax1* Doppelmutanten. RLN = Rosettenblätter bis zur Blüte; DTF = Tage bis zur Blüte; Exp. 1 = % Seitentriebe in Stängelblattachseln des 1. Experiments. In der *constans* segregierenden Population konnten zu diesem Zeitpunkt keine homozygoten *las rax1 co* Dreifachmutanten isoliert werden; Exp. 2 = % Seitentriebe in Stängelblattachseln im 2. Experiment. Vertikale Fehlerindikatoren: Standardabweichung. Alle Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen.

Die durch *constans* vermittelte späte Blühinduktion war epistatisch über den frühblühenden Phänotyp der *las* Mutante (RLN: $18,62 \pm 1,27$) und *las co* Doppelmutanten bildeten 60,6 ($\pm 1,94$) Rosettenblättern zur Blüte, vergleichbar mit *co* Einzelmutanten die eine Bildung von durchschnittlich 58,8 ($\pm 2,63$) Rosettenblätter bis zur Blüte benötigten (Abb. 3-16 E). *constans* Einzel-, sowie *las co* Doppelmutanten die parallel zu Pflanzen der *FRI* und der *las FRI* Linie unter gleichen Wachstumsbedingungen angezogen wurden, blühten im Vergleich ungefähr drei Wochen früher (Abb. 3-14 B; Abb. 3-16 E). Der durch *FRIGIDA* verursachte reprimierende Effekt der Blühinduktion war somit stärker als die durch Mutationen in *constans* verursachte, verzögerte Blüte.

Putterill *et al.* konnten zeigen, dass transgene Pflanzen mit multiplen Kopien des Gens *CONSTANS* signifikant früher blühten als zugehörige Wildtyppflanzen und wiesen damit für *CONSTANS* eine haploinsuffiziente Wirkungsweise nach (Putterill *et al.*, 1995; Robson *et al.*, 2001). Diese Wirkungsweise von *CONSTANS* konnte auch bei der Etablierung von *las rax1 co* Dreifachmutanten beobachtet werden (Abb. 3-16 F). In homozygoten *las rax1* Doppelmutanten, in denen nur das mutante *constans* Allel segregierte, zeigten Pflanzen in Abhängigkeit der genetische Konstitution am *CO* Locus einen signifikanten Unterschied verschiedener Merkmale (Abb. 3-16 F). So waren *las rax1* Doppelmutanten die Heterozygotie für das mutante *co* Allel aufwiesen, spätblühender als *las rax1* Doppelmutanten, jedoch frühblühender als *las rax1 co* Dreifachmutanten bezüglich der Rosettenblattanzahl, sowie den Tagen bis zur Blüte (Abb. 3-16 F). Dieser Dosiseffekt von *CONSTANS* konnte auch bei der Anlage von Lateralmeristemen in Stängelblattachsen beobachtet werden. *las rax1* Doppelmutanten mit heterozygoten *constans* Allelen zeigten einen stärkeren Seitentriebdefekt in Blattachsen am Haupttrieb im Vergleich zu *las rax1* Doppelmutanten mit funktionellen *CO* Allelen (Abb. 3-16 F). Der beobachtete Verzweigungsdefekt zeigte erneut hohe Variabilität und rangierte in zwei unabhängigen Experimenten zwischen 3,8% ($\pm 6,73$) Seitentriebe in Stängelblattachsen und 22,4% ($\pm 23,54$) (Abb. 3-16 F, siehe Exp. 1 und Exp. 2).

Zur Überprüfung, ob der durch *FRIGIDA* vermittelte Seitentriebdefekt in Pflanzen der Linie *las rax1 FRI* direkt oder indirekt durch *FRIGIDA* vermittelt wurde, wurde die *las rax1 co* Dreifachmutante phänotypisch auf die Seitentriebbildung in Stängelblattachsen untersucht.

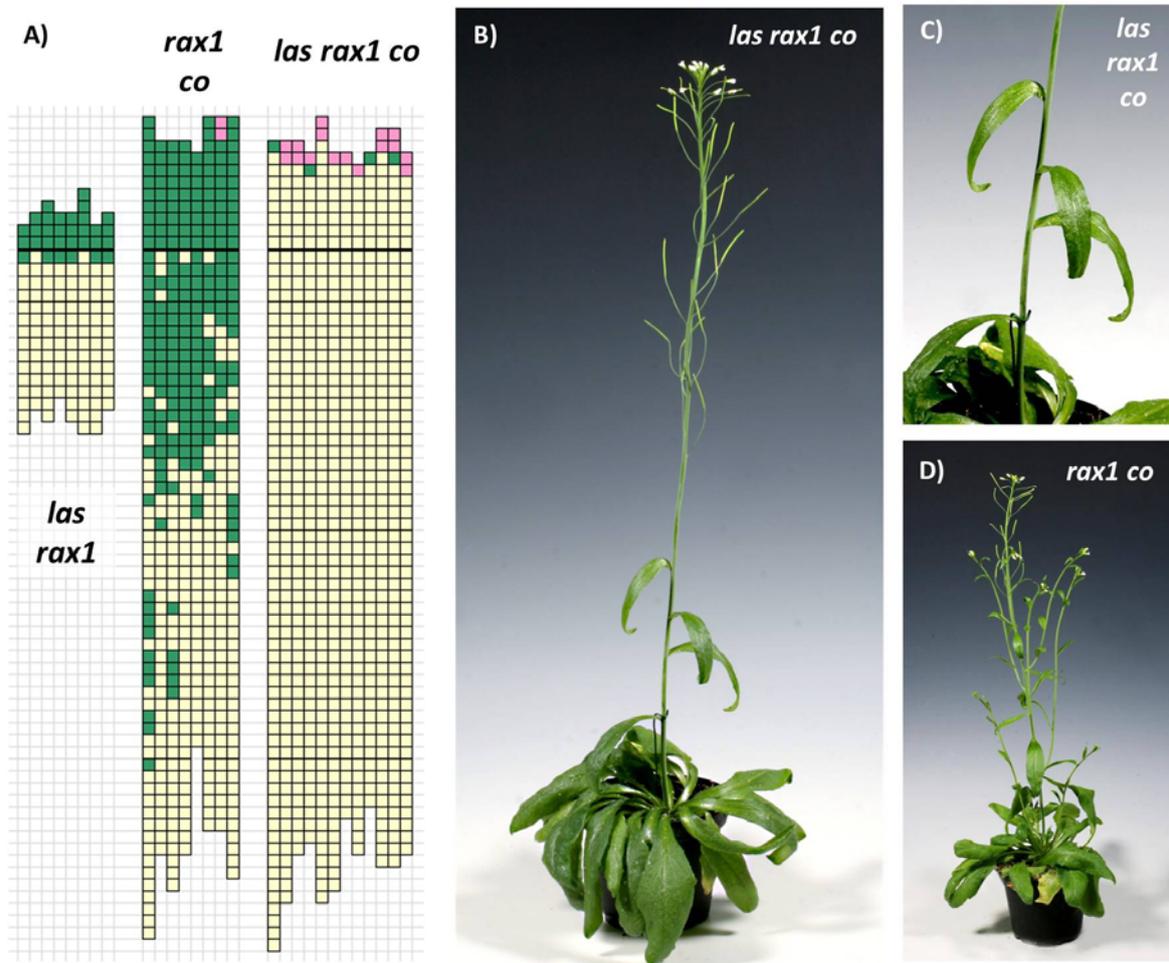


Abb. 3-17: Phänotyp der *las rax1 co* Dreifachmutante unter Langtagbedingungen.

(A) Seitentriebbildung in *las rax1 co* Dreifachmutanten. Farben: grün = Knospe/ Seitentrieb; gelb = Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs; rosa = Blüte anstelle eines Seitentriebs. (B) Habitus einer *las rax1 co* Dreifachmutante. (C) Stängelausschnitt der *las rax1 co* Dreifachmutante aus (B). Die Anlage axillärer Meristeme in Stängelblattachseln ist nahezu vollständig unterdrückt. (D) Habitus einer *rax1 co* Doppelmutter (Col-0). Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen.

Einzelmutanten des Gens *RAX1* zeigen bei Wachstum in kurzen Photoperioden eine defekte Anlage axillärer Meristeme in den ältesten Rosettenblattachseln (Müller *et al.*, 2006). Dieser Verzweigungsdefekt ist tageslängenabhängig und nicht sichtbar unter Langtagbedingungen (Abb. 3-15 A; Müller *et al.*, 2006). Durch die Mutation in *CONSTANS* zeigten *rax1 co* Doppelmutter unter Langtagbedingungen, den für *rax1* unter kurzen Photoperioden beschriebenen Seitentriebdefekt während der frühen vegetativen Phase in Rosettenblattachseln (Abb. 3-17 A und D). Pflanzen mit mutanten *las* und *rax1* Allelen wiesen den unter langen Photoperioden typischen *las* Verzweigungsdefekt auf (Abb. 3-17 A). Bei der Seitentriebanalyse der Dreifachmutanten *las rax1 co* in langen Photoperioden konnte der gleiche verstärkte *las* Verzweigungsdefekt

wie in Pflanzen der Linie *las rax1 FRI* festgestellt werden. Pflanzen der Dreifachmutante *las rax1 co* bildeten nahezu keine Seitentriebe aus Rosetten- und Stängelblattachseln (Abb. 3-17 A, B und C). Die wenigen, angelegten Lateralmeristeme in Stängelblattachseln besaßen häufig die Identität eines Blütenmeristems und differenzierten in der Bildung von Blüten (Abb. 3-17 A).

3.2.1.3. Phänotypische Charakterisierung der *las lfy* Doppelmutante

Die Aktivität von LAS ist essentiell für die Anlage von Lateralmeristemen während der vegetativen Entwicklung der Pflanze (Greb *et al.*, 2003). Obwohl LAS nicht nur in Blattachseln von Rosettenblättern, sondern auch in Stängelblattachseln exprimiert ist, zeigen *las* Mutanten keinen Seitentriebdefekt während der reproduktiven Entwicklung in Blattachseln des Haupttriebs, so dass die Aktivität redundanter Faktoren vermuten wurde (Greb *et al.*, 2003). Neben den Kreuzungen der *las* Einzel- und *las rax1* Doppelmutante mit der *FRI* Linie und der *constans* Mutante, wurde die Interaktion von LAS mit einem weiteren Blühzeitpunktregulator, dem pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktor LFY, in *las lfy* Doppelmutanten untersucht.

LEAFY fördert als so genanntes „*floral integrator*“ Gen den Übergang vom vegetativen SAM zum reproduktiven Infloreszenzmeristem (IM). Die Aktivität von LFY wird zum einen indirekt über *CONSTANS* durch den tageslängenabhängigen Stoffwechselweg gefördert und zum anderen über den GA-hormonabhängigen Stoffwechselweg (Jarillo and Pineiro, 2011; Srikanth and Schmid, 2011; Irish, 2010). Im Gegensatz zu *CONSTANS*, besitzt *FRIGIDA* einen negativen Einfluss und wirkt über die Aktivierung der *FLC* Expression ebenfalls indirekt auf *LEAFY*. Neben der Funktion als *floral integrator* Gen fördert *LEAFY* als Blütenmeristem-Identitätsgen die Aktivierung der Blütenorgan-Identitätsgene, die Bildung von Blütenmeristemen am IM und die Initiation von Blütenorganen. In *lfy* Mutanten kann der Wechsel vom vegetativen SAM zum reproduktiven IM unter anderem durch redundante Wirkung von *SOCI* und *FT* übernommen werden (Wigge, 2011; Kaufmann *et al.* 2010; Lee and Lee, 2010; Henderson and Dean, 2004). Die durch LEAFY vermittelte Bildung von Blütenmeristemen kann in *leafy* Mutanten mit starken Allelen wie *lfy-14*, nicht übergangen werden und mutante Pflanzen sind steril, da sie am SAM weiterhin Blattprimordien anstelle von

Blütenmeristemen bilden (Weigel *et al.*, 1992). In den Blattachsen der angelegten Blätter werden nach der Blühinduktion Seitentriebe mit reproduktivem Charakter initiiert, die ebenfalls ausschließlich Blätter anstelle von Blüten anlegen (Weigel *et al.*, 1992).

Samen der *las lfy* Doppelmutante waren bereits im Labor vorhanden. Die phänotypische Charakterisierung der *las lfy* Doppelmutante durch Clarenz (Clarenz, 2004), offenbarte bereits einen verstärkten *las* Verzweigungsdefekt in Stängelblattachsen (Clarenz, 2004). Nach damaligem Kenntnisstand sollte die Analyse der *las lfy* Doppelmutanten in erster Linie klären, ob bei einem unvollständigen Übergang vom vegetativen SAM zum IM, *las* Mutanten Seitentriebe aus Stängelblattachsen bilden können. Zur detaillierteren Funktionsanalyse von *LAS* während der reproduktiven Phase, wurde die *las lfy* Doppelmutante, sowie die *lfy* Einzelmutante erneut phänotypisch auf die Anlage von Seitentrieben untersucht.

Da *leafy* Mutanten unter kontinuierlichen Kurztagbedingungen einen stärkeren Verzweigungsdefekt ausprägen, wurden die Pflanzen für die Seitentriebanalyse durchgängig in kurzen Photoperioden angezogen (Clarenz, 2004). Durch die lange vegetative Entwicklungsphase bilden Pflanzen des Wildtyps Columbia und *las* Einzelmutante unter Kurztagbedingungen mehr Rosetten- und Stängelblätter als unter langen Photoperioden (Abb. 3-18 A; Abb. 3-16 A). Die Seitentriebanalyse der *lfy* Einzelmutanten zeigte keinen Defekt in der Anlage von Lateralmeristemen in Rosettenblattachsen, sondern nur den bereits beschriebenen, geringen Defekt in Stängelblattachsen (Abb. 3-18 A; Clarenz, 2004).

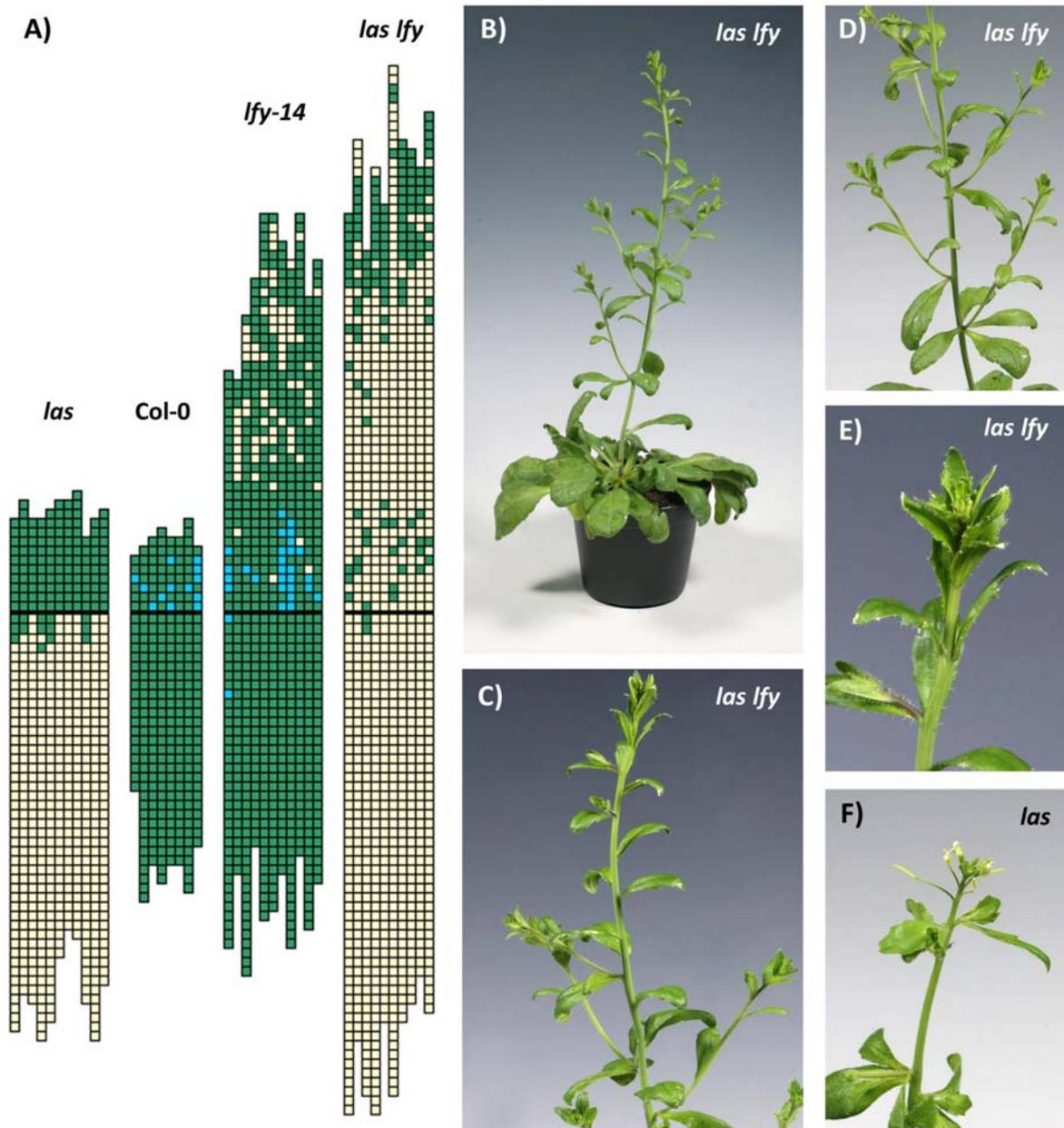


Abb. 3-18: Phänotyp der *las lfy* Doppelmutante unter Kurztagbedingungen.

(A) Seitentriebbildung in *las lfy* Doppelmutanten. Farben: grün = Knospe/ Seitentrieb; gelb = Fehlen einer Knospe/ Seitentriebs; blau = akzessorische Knospe/ Seitentrieb. (B) Habitus einer *las lfy* Doppelmutante (Col-0). (C) Oberer Stängelausschnitt der *las lfy* Doppelmutante aus (B). (D) Unterer Stängelausschnitt der *las lfy* Doppelmutante aus (B). (E) Sprossspitze einer *las lfy* Doppelmutante. Durch die verwendete *leafy* Mutante mit dem starken Allel *lfy-14* sind *lfy* Einzel-, sowie *las lfy*-Doppelmutanten steril und bilden am SAM nur Blätter anstelle von Blüten. (F) Infloreszenz einer *las* Einzelmutante. Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen.

In *lfy* Mutanten wurden unter den hier verwendeten Wachstumsbedingungen in durchschnittlich ~85% ($\pm 2,78$; Mittelwert aus Daten zweier unabhängiger Experimente) der vorhandenen Stängelblattachsen Lateralmeristeme angelegt, wohingegen Pflanzen der

las Mutante und des Wildtyp Columbia in jeder Stängelblattachsel einen Seitentrieb bildeten (Abb. 3-18 A). Die Initiation akzessorischer Knospen in *lfy* Einzelmutanten war auch in Columbia Pflanzen zu beobachten (Abb. 3-18 A). In *lfy* Mutanten war die Anlage von Lateralmeristemen hauptsächlich in den oberen beiden Dritteln des Haupttriebs gestört und ältere Stängelblattachsen waren nicht betroffen (Abb. 3-18 A). Im Gegensatz zu Columbia und *las* Mutanten bildeten *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten mehr Blätter am Haupttrieb (Abb. 3-18 A; Clarenz, 2004). Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass in Kontrollpflanzen während der späten reproduktiven Phase die Bildung von Blättern zugunsten von Blüten eingestellt wird. Dieser Übergang ist in *leafy* Mutanten gestört, so dass starke *lfy* Allele, wie das verwendete *lfy-14* Allel, zur Bildung von Blattprimordien anstelle von Blütenprimordien am SAM und dadurch zu Sterilität führen (Abb. 3-18 E und F). Zusätzlich zu dem Meristem- und Verzweigungsphänotyp konnte die für *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten beschriebene aufrechte Blattstellung in Stängelblattachsen ohne Lateralmeristeme beobachtet werden, wie sie auch in BC1F2 Pflanzen der Kreuzung *las/C24* zu sehen war. (Abb. 3-18 C und E; Abb. 3-6 E; Clarenz, 2004).

Der verstärkte *las* Verzweigungsdefekt in *las lfy* Doppelmutanten wurde bereits beschrieben (Clarenz, 2004). Unter den hier verwendeten Wachstumsbedingungen bildeten *las lfy* Doppelmutanten in durchschnittlich 28% ($\pm 1,3$) der Blattachsen am Haupttrieb axilläre Meristeme, vergleichbar mit dem beschriebenen Phänotyp (Mittelwert aus Daten dreier unabhängiger Experimente; Abb. 3-18 A und B). Die wenigen Stängelblätter in deren Achseln Lateralmeristeme angelegt wurden, waren nach Clarenz unregelmäßig entlang der Sprossachse verteilt, wohingegen sich unter den hier verwendeten Bedingungen ein zonaler Seitentriebdefekt entlang der Sprossachse, wie auch in *lfy* Einzelmutanten, abzeichnete. Hierbei war die gestörte Seitentriebbildung überwiegend in Stängelblattachsen in den unteren beiden Dritteln des Haupttriebs, in Achseln der Stängelblätter $\sim 10 - 30$, sichtbar (Abb. 3-18 A und C). Neben dem Seitentriebdefekt waren *las lfy* Doppelmutanten zu einem frühen Zeitpunkt in der reproduktiven Entwicklung dennoch in der Lage axilläre Meristeme anzulegen und etliche der ältesten Stängelblattachsen bildeten Seitentriebe (Abb. 3-18 A und D). Diese Fähigkeit zeigte sich auch zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt. Nach Initiation von ungefähr 30-35 Blattprimordien am Apikalmeristem zeigte sich in *las lfy* Doppelmutanten erneut die Anlage reproduktiver Seitentriebe in Stängelblattachsen, die ebenfalls wie das Hauptmeristem nur Blattprimordien bildeten (Abb. 3-18 A).

Dieser bisher unbekannte, zonale Verzweigungsdefekt entlang der Sprossachse in *las lfy* Doppelmutanten konnte in drei unabhängigen Experimenten beobachtet werden und erinnerte sehr an die überlappende Funktion der *RAX* Gene zur Seitentriebbildung entlang der Wachstumsachse. Da bei vorherigen Experimenten ausschließlich Dreifachmutanten ein abweichendes *las* Verzweigungsmuster aufwiesen, wurde vermutet, dass *LEAFY* einen direkten Einfluss auf einen genetischen Faktor zur Anlage von Lateralmeristemen während der reproduktiven Phase haben muss. Da *las rax1* Doppelmutanten auch einen Seitentriebdefekt während der reproduktiven Entwicklung besitzen (Müller *et al.*, 2006), wurde in weiteren Experimenten die Interaktion zwischen *LAS*, *RAX1* und *LEAFY* untersucht.

3.2.2. Genetische Analysen zur Interaktion von *LAS*, *RAX1* und *LFY*

3.2.2.1. Analyse der gewebespezifischen *RAX1* Expression in Apices von *leafy* Mutanten

Zur Analyse der genetischen Interaktion zwischen *LAS*, *RAX1* und *LFY* wurde die gewebespezifische *RAX1* Expression in Apices von *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten untersucht. Dazu wurden Pflanzen für 28 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen.

Während der vegetativen Entwicklung wurden *RAX1* Transkripte in Achseln von Blattprimordien der Stadien P0 bis P10/P11 nachgewiesen (Müller *et al.*, 2006). Das in Columbia charakterisierte kreisförmige *RAX1*-Expressionsmuster im adaxialen Zentrum der Blattachsel war in *las* Mutanten unverändert (Abb. 3-19 A und B; Müller, 2006). In Apices von *lfy* Einzel-, sowie *las lfy* Doppelmutanten zeigte die zelluläre *RAX1* Verteilung keine Abweichung des beschriebenen Expressionsmusters (Abb. 3-19 C und D). Im Vergleich zu *las* Mutanten und Pflanzen des Ökotyp Columbia schien die *RAX1* Expression in *lfy* und *las lfy* Mutanten reduziert (Abb. 3-19, Pfeile in C und D). Dabei wurde in 7 von 10 betrachteten *lfy*-Apices ein schwaches Signal wie in Abb. 3-19 beobachtet, wohingegen die restlichen drei Apices ein stärkeres Signal zeigten, jedoch schwächer als die Expression in Columbia oder *las* Pflanzen. Gleiche Ergebnisse konnten für *las lfy* Doppelmutanten ermittelt werden.

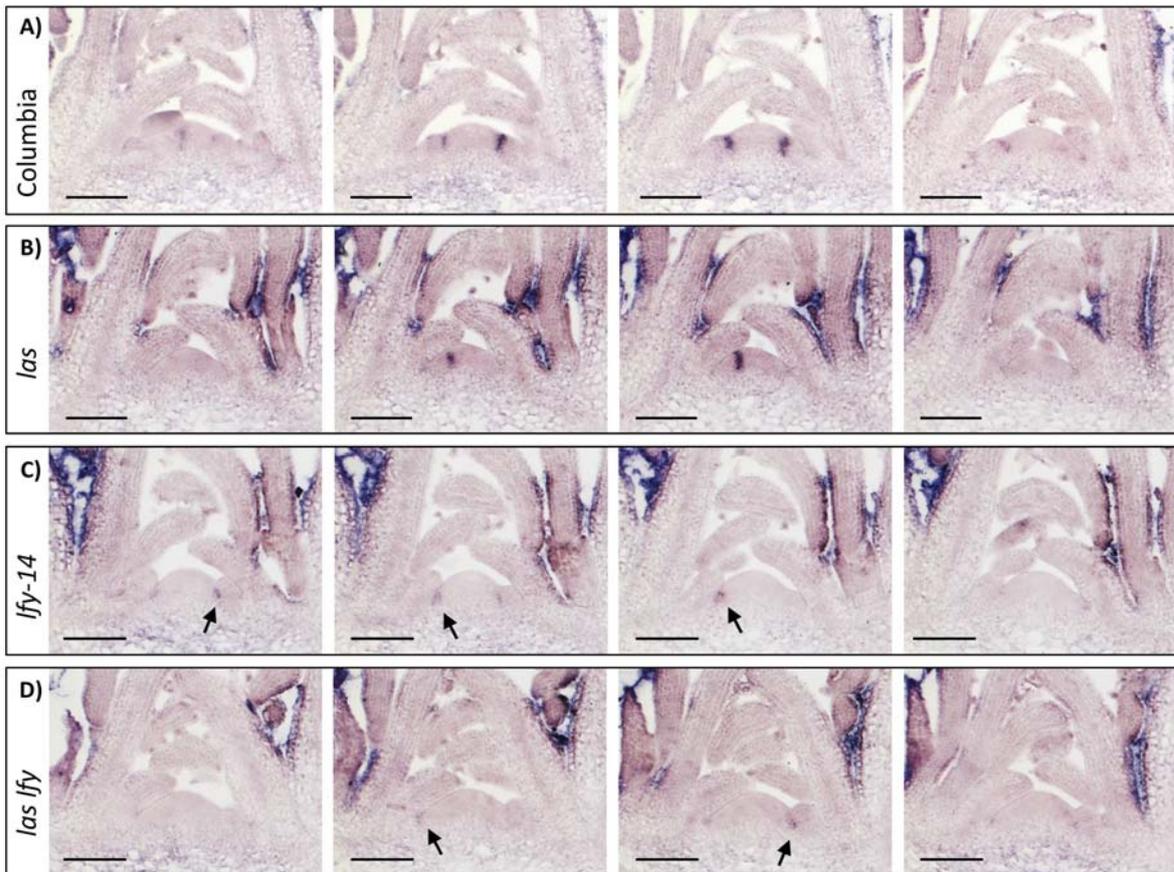


Abb. 3-19: *RAX1* Transkript-Akkumulation in vegetativen Apices von *leafy* Mutanten.

RAX1 Expression in Längsschnitten vegetativer Apices von (A) Col-0, (B) *las* Mutante, (C) *lfy-14* Mutante und (D) *las lfy* Doppelmutante. Gezeigt sind für jeden Genotyp aufeinander folgende 8µm Schnitte durch das vegetative Meristem. Pfeile deuten auf die Expressionsdomäne in Achseln junger Blattprimordien. Pflanzen wurden für 28 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen. Maßstab: 100µm.

Nach Müller *et al.* war die zelluläre Verteilung der *RAX1* Transkripte nach der Blühinduktion vergleichbar mit der Expression im vegetativen Meristem und mRNA Transkripte konnten in Blütenprimordien der Entwicklungsstadien 0 und 1 ermittelt werden (Müller *et al.*, 2006). Für weitere Analysen wurde die *RAX1* Expression während der reproduktiven Entwicklung näher untersucht.

Der Myb-Transkriptionsfaktor *RAX1* war auch nach der Blühinduktion in Columbia und *las* Mutanten vergleichbar exprimiert und ließ sich in Blütenprimordien P0 bis P9/P10 dreier Entwicklungsstadien in unterschiedlichen Expressionsdomänen nachweisen (Abb. 3-20, 3-21). Zusätzlich konnte die Expression in Knospen von Stängelblattachseln entlang der Sprossachse festgestellt werden (Abb. 3-20 H).

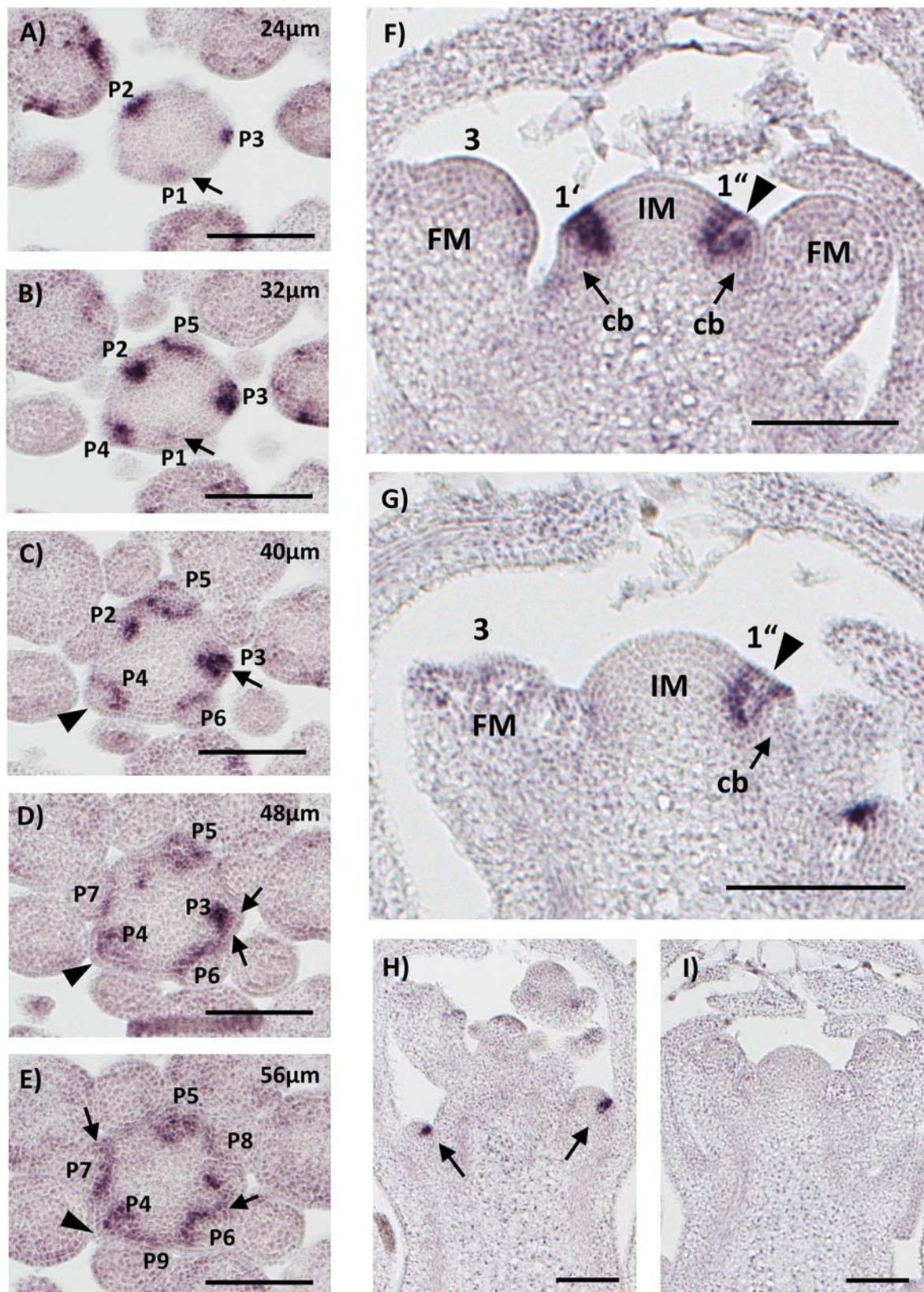


Abb. 3-20: *RAX1* Transkript-Akkumulation in reproduktiven Apices von Columbia und *las*-Mutanten.

(A-E) *RAX1* Expression in aufeinander folgenden 8 μm Querschnitten eines reproduktiven Apex des Ökotyp Col-0. Gekennzeichnet sind durchnummerierte Blütenprimordien am IM von P1 bis P9. (F und G) Längsschnitte durch reproduktive Apices von (F) Col-0 und (G) *las* Mutante. Zahlen geben die Entwicklungsstadien der Blütenprimordien an: 1' = frühes Stadium 1; 1'' = spätes Stadium 1. (H) *RAX1*

Expression in Knospen von Stängelblättern in Col-0 und *las* Mutante, exemplarisch gezeigt am Apex einer *las*-Mutante. (I) *RAXI* Sinn-Sonde in reproduktivem Apex des Ökotyp Col-0. Pflanzen wurden 28 Tage in Kurztag- und anschließend 7 Tage in Langtagbedingungen angezogen. FM = Blütenmeristem; IM = Infloreszenzmeristem; cb = reduziertes Hochblatt (*cryptic bract*; nach Long and Barton, 2000); Pfeile und Pfeilspitzen, siehe Text; Maßstab: 100µm.

In Blütenprimordien des Entwicklungsstadiums 0, ein Stadium bei dem am IM noch keine morphologische Veränderung erkennbar ist, akkumulierten *RAXI* Transkripte im gesamten Bereich des Blütenprimordiums (Abb. 3-21 A; Abb. 3-20 A und B, Pfeile; Long and Barton, 2000).

Blütenprimordien des 1. Entwicklungsstadiums wurden von Smyth *et al.* durch eine sichtbare Aufwölbung am IM beschrieben (Smyth *et al.*, 1990). Im frühen Blütenstadium 1 (Abb. 3-20 F, siehe 1') waren *RAXI* Transkripte auf den adaxialen Bereich des Blütenprimordiums begrenzt und co-lokalisiert mit der beschriebenen Expressionsdomäne des KNOX Gens *STM* (Abb. 3-20 F; Abb. 3-21 D; Long and Barton, 2000). Dabei konnte keine *RAXI* Transkript-Akkumulation im abaxialen Bereich des Primordium ermittelt werden, in dem auch die *STM*-Expression ausgeschlossen ist (Abb. 3-20 F, Pfeil; siehe auch veränderte P3-Expression in Abb. 3-20 C und D, Pfeile; Long and Barton, 2000). Dieser Bereich besitzt durch Expression des Gens *AINTEGUMENTA* (*ANT*) Blattidentität und markiert die primordiale Region, die in vielen Arten während der weiteren Entwicklung das Blüten-unterstützende Hochblatt bildet (Long and Barton, 2000). In *Arabidopsis* ist die Bildung dieses Hochblattes unterdrückt (Smyth *et al.*, 1990; Long and Barton, 2000). Die *in-situ*-Analyse in Längsschnitten zeigte weiter, dass während der fortschreitenden Entwicklung die *RAXI* Expression genauer definiert wird, wie es auch für das KNOX Gen *STM* in Blütenprimordien beschrieben wurde (Long and Barton, 2000). Dabei sinkt die *RAXI*-Expression im späten 1. Blütenstadium (Abb. 3-20 F und G, siehe 1'' Pfeilspitze) im adaxialen Bereich des Primordiums und Transkripte werden auf die adaxiale und abaxiale Grenzregion zwischen dem IM und dem adaxialen Bereich des Blütenprimordiums begrenzt, sowie die Grenzregion zwischen dem adaxialen Bereich des Primordiums und der Region des *ANT*-definierten Tragblattes (Abb. 3-20 F und G; siehe auch sich verändernde P4-Expression in Abb. 3-20 B-E, Pfeilspitzen).

In Blütenprimordien der Stadien 2, bei der sich das Primordium durch Bildung einer Furche vom IM abtrennt, begrenzt sich die Akkumulation der *RAXI* Transkripte in einer bogenförmigen Expressionsdomäne auf die adaxiale Grenzregion zwischen dem IM und dem Blütenprimordium (Abb. 3-20 E, Pfeile; Abb. 3-21 C).

In Stufe 3 der Blütenentwicklung, wenn die Sepalenprimordien sichtbar werden (Long and Barton, 2000), konnten *RAX1* Transkripte weder in Apices des Ökotyp Columbia, noch in *las* Mutanten, nachgewiesen werden (Abb. 3-20 F und G).

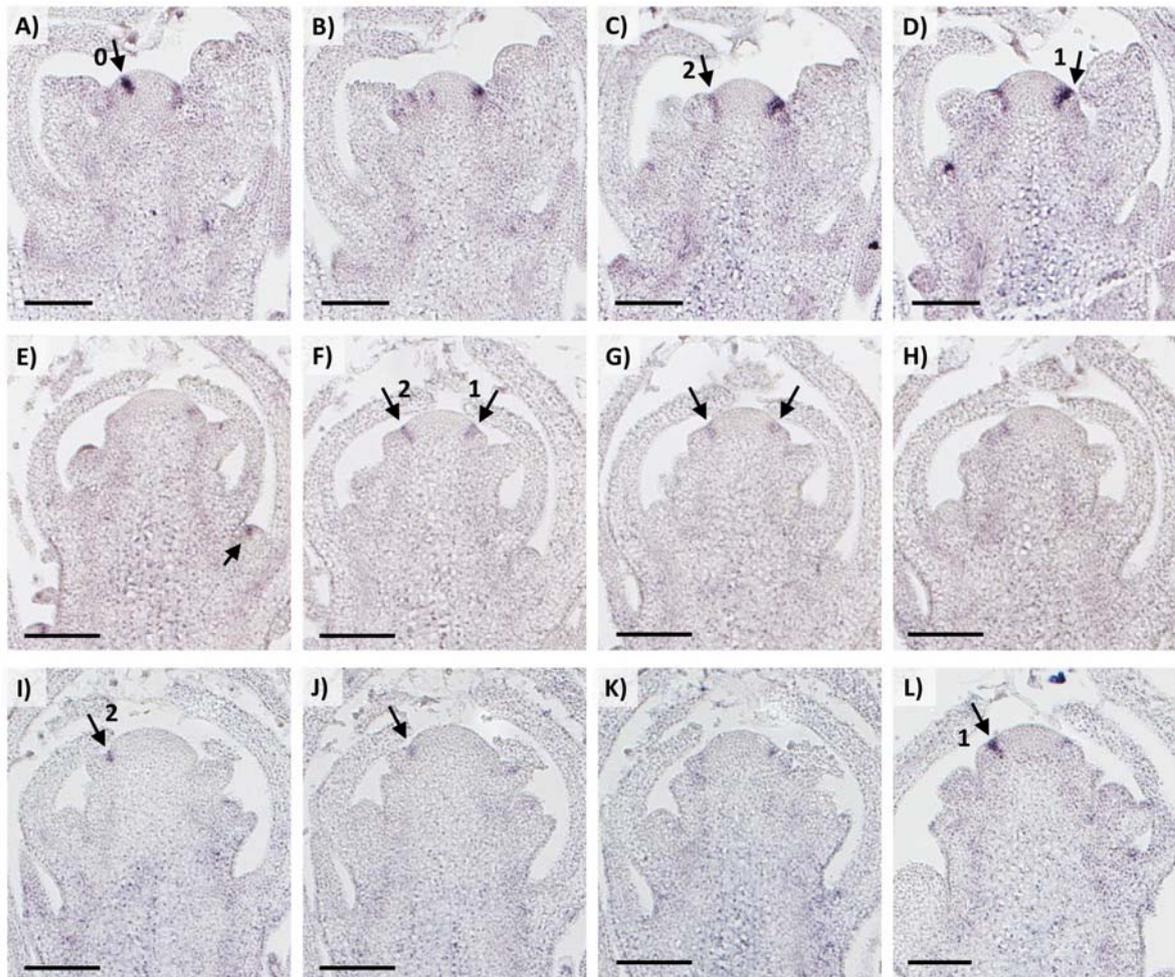


Abb. 3-21: *RAX1* Transkript-Akkumulation in reproduktiven Apices von *leafy* Mutanten.

RAX1 Transkript-Akkumulation nach 48stündiger Farbreaktion in reproduktiven Apices von **(A-D)** *las* Mutante, **(E-H)** *lfy* Mutante und **(I-K)** *las lfy* Doppelmutante. Gezeigt sind aufeinander folgende 8µm Schnitte durch das reproduktive IM. Pfeile deuten auf die Expressionsdomäne und nebenstehende Zahlen geben die Entwicklungsstadien der Blütenprimordien an. **(L)** *RAX1* Expression in Apex von *lfy* Einzelmutante nach 72stündiger Farbreaktion. Die Signalintensität der *RAX1* Expression wird bei längerer Inkubation der Farbreaktion stärker. Pflanzen wurden 28 Tage in Kurztag- und anschließend 7 Tage in Langtagbedingungen angezogen. Maßstab: 100µm.

Die Analyse der *RAX1* Expression in reproduktiven Apices von *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten schien stark reduziert (Abb. 3-21 E-K). Im Vergleich zu Apices von *las* Mutanten (Abb. 3-21 A-D) und Columbia zeigten *lfy* und *las lfy* Mutanten bei identischer Inkubationszeit der enzymatischen Farbreaktion nur sehr schwache *RAX1* Signale (Abb. 3-

21 E-K). *RAX1* Transkripte akkumulierten hauptsächlich im adaxialen Grenzbereich zwischen dem IM und Blütenprimordien der Stadien 1 und 2 (Abb. 3-21 F, G, I, J und L, Pfeile). Die in Apices von Columbia und *las* Mutanten beobachtete Expression in den jüngsten Blütenprimordien P0 (Abb. 21 A), konnte in *lfy* und *las lfy* Mutanten nicht nachgewiesen werden. Die Expression in lateralen Knospen zeigte sich sowohl in *lfy* Einzel-, als auch in *las lfy* Doppelmutanten (Abb. 3-21 E).

Diese Ergebnisse deuteten an, dass der Blühzeitpunktregulator *LEAFY* einen direkten Einfluss auf die Expression des Verzweigungsregulators *RAX1* während der reproduktiven Entwicklung der Pflanze besitzt. Um die beobachtete reduzierte *RAX1* Expression zu überprüfen, sollten die endogenen *RAX1* Transkriptlevel in *leafy* Mutanten durch Anwendung einer quantitativen Real-Time-PCR ermittelt werden. Zusätzlich wurde der Einfluss von *LEAFY* auf die Expression von *LAS* untersucht.

3.2.2.2. Quantitative *LAS* und *RAX1* Expressionsanalysen in Apices von *leafy* Mutanten

Die quantitative Analyse endogener Expressionslevel des zu untersuchenden Gens, verlangt die Normalisierung der ermittelten Daten gegen simultan ermittelte Expressionsdaten eines Referenzgens. Dabei sollte das verwendete Referenzgen zu jeder Entwicklungsphase in allen Pflanzengeweben gleich aktiv sein und keine Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und Mutante aufweisen. Da Gene wie *LAS* und *RAX1* in nur wenigen, definierten Zellen exprimiert sind, sollte als Referenzgen zur Normalisierung ein Gen verwendet werden, das ein ähnliches Expressionsmuster aufweist und ähnlich stark exprimiert ist. Gene wie *STM*, *WUS* oder *CLV3*, sind zur Aufrechterhaltung der meristematischen Aktivität, ähnlich wie *RAX1* und *LAS*, in wenigen, definierten Expressionsdomänen aktiv. Diese Gene eigneten sich jedoch nicht als Referenzgene, da bspw. Gene wie *STM*, in *las* Mutanten durch die fehlende Initiation axillärer Meristeme, im Vergleich zum Wildtyp niedriger exprimiert sind (Greb *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2006). *CUC3*, ein NAC-Domäne enthaltender Transkriptionsfaktor, ist während der vegetativen Entwicklung ähnlich wie *LAS* in Achseln von Blattprimordien exprimiert und Raman *et al.* zeigten, dass die Expression von *CUC3* in *las* Mutanten unverändert ist (Raman *et al.*, 2008). Mittels der quantitativen Real-Time-PCR sollte untersucht werden, ob *CUC3* in *las* und *lfy* Mutanten auch in unterschiedlichen

Entwicklungsstadien der Pflanze eine identische Expression wie der Wildtyp Columbia zeigt und sich somit als Referenzgen eignet. Dazu wurden Proben von Pflanzen getestet, die 28 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, sowie Proben von Pflanzen die zusätzlich 7 Tage durch lange Photoperioden zur Blüte induziert wurden. Die Auswertung der qRT-Analyse zeigte, dass *CUC3* während der vegetativen Entwicklung im Wildtyp Columbia, in *las* und *lfy* Mutanten, sowie in *las lfy* Doppelmutanten gleich stark exprimiert ist (Abb. 3-22 A). Nach der Blühinduktion sinkt die Expression in allen betrachteten Linien auf ein vergleichbares Niveau. Da die Expression von *CUC3* abhängig ist von der Entwicklungsphase der Pflanze, wurde *CUC3* nicht als Referenzgen verwendet.

Aufgrund der Problematik, dass Gene mit ähnlichen Expressionsdomänen wie *LAS* und *RAX1*, in der *las* Mutante meist differentiell exprimiert sind (Greb *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2006), wurde stattdessen für zukünftige qRT-Analysen das Gen *PP2A* verwendet. Analysen konnten zeigen, dass *PP2A* in nahezu allen Geweben und in allen Entwicklungsstadien der Pflanze exprimiert ist (Czechowski *et al.*, 2005).

Um den möglichen Einfluss von *LEAFY* auf die Aktivität des Verzweigungsregulators *LAS* zu untersuchen, wurde die *LAS* Expression in *leafy* Mutanten während der vegetativen und reproduktiven Entwicklung getestet (Abb. 3-22 B). Während der vegetativen Entwicklung besitzt *LEAFY* einen negativen Einfluss auf die Expression von *LAS* und *lfy* Mutanten zeigten eine höhere *LAS* Expression als Pflanzen des Wildtyps Columbia. Nach der Blühinduktion steigt die Aktivität von *LAS* in Columbia um ungefähr 50%, wohingegen in *leafy* Mutanten die *LAS* Expression sinkt. Die Ergebnisse dieser qRT-PCR zeigten, dass *LEAFY* nicht nur während der vegetativen, sondern auch während der reproduktiven Phase einen Einfluss auf die Expression des Verzweigungsregulators *LAS* besitzt. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors *LEAFY* ist damit notwendig für die verstärkte Expression von *LAS* nach der Blühinduktion.

In *las-4* Mutanten führt eine Deletion von 20bp, sowie die Insertion einer zusätzlichen Base, zu einem frühzeitigen Stop-Codon und dadurch zu einem verkürzten Protein (Greb *et al.*, 2003). Die Expression des *las* Gens ist während der vegetativen Wachstumsphase vergleichbar mit Transkript-Level in Pflanzen des Ökotyp Columbia (Abb. 3-22 B). Überraschenderweise wird die *las* Expression in *las* Mutanten nach der Blühinduktion nicht wie in Columbia verstärkt. Im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyp ist das lateral suppressor Protein in *las* Mutanten als einziges Protein nicht funktionell. Diese Ergebnisse deuteten daraufhin, dass das *LAS* Protein nach der Induktion zur Blüte, direkt oder

indirekt, die eigene Expression reguliert und abhängig ist von Signalen der blüh-induzierenden Stoffwechselwege.

Die phänotypische Charakterisierung der *las lfy* Doppelmutante spiegelte einen zonalen Seitentriebdefekt entlang der Sprossachse nach der Blühinduktion wider (Abb. 3-18). *In-situ*-Hybridisierungen mit RNA-Sonden gegen Transkripte des Verzweigungsregulators *RAX1*, zeigten eine reduzierte *RAX1* Transkript-Akkumulation in *lfy* und *las lfy* Doppelmutanten (Abb. 3-21). Es wurde vermutet, dass die verringerte *RAX1* Expression in *las lfy* Doppelmutanten die Ursache für den verstärkten *las* Seitentriebdefekt ist. Um dies zu bestätigen, wurde die *RAX1* Expression in *leafy* Mutanten mittels quantitativer Real-Time-PCR überprüft.

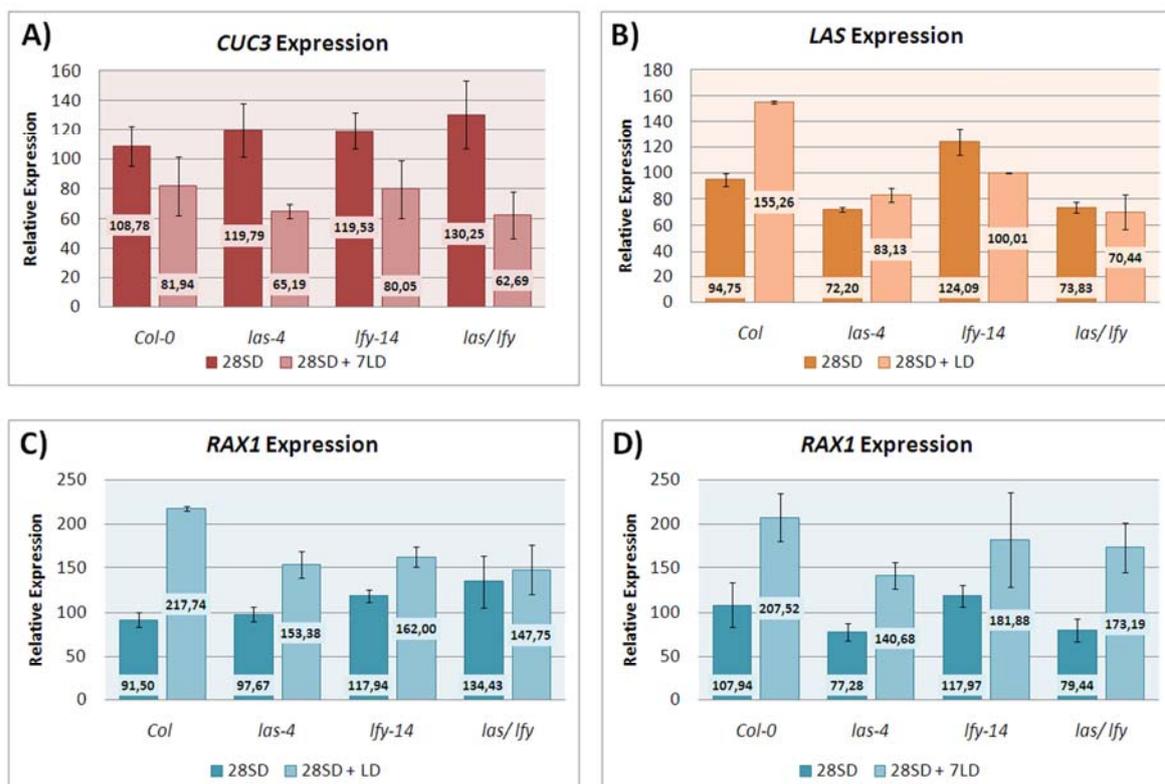


Abb. 3-22: Transkript-Level der Gene *CUC3*, *LAS* und *RAX1* in *leafy* Mutanten während der pflanzlichen Entwicklung.

(A) *CUC3* Expression in *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten. Angegeben sind die Mittelwerte von vier biologischen Replikaten. (B) *LAS* Expression in *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten. Angegeben sind die Mittelwerte von zwei biologischen Replikaten. (C und D) *RAX1* Expression in *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten zweier unabhängiger Experimente. Angegeben sind die Mittelwerte von (C) zwei und (D) drei biologischen Replikaten. Wachstumsbedingungen: 28SD = 28 Tage unter Kurztagbedingungen; 28SD+LD = 28 Tage unter Kurztag-, und anschließend 7 Tage unter Langtagbedingungen. Vertikale Fehlerindikatoren: Standardabweichung. Zur Normalisierung wurden in allen Experimenten simultan ermittelte Expressionsdaten des Gens *PP2A* verwendet.

Während des vegetativen Wachstums war die Expression des Myb-Transkriptionsfaktors *RAX1* in Columbia und *las* Mutanten, sowie in *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten nahezu vergleichbar (Abb. 3-22 C). *leafy* Mutanten zeigten leicht erhöhte *RAX1* Transkript-Level im Vergleich zu Pflanzen der Kontrollpopulationen. Nach der Blühinduktion steigt die Expression des Myb-Gens im Ökotyp Columbia um mehr als 100% an. Eine Erhöhung der *RAX1*-Expression war auch in *las* und *lfy* Einzelmutanten zu beobachten, jedoch geringer, um nur ~50%, als in Pflanzen des Wildtyp Columbia (Abb. 3-22 C). *las lfy* Doppelmutanten hingegen zeigten vegetativ eine ~50% höhere Expression als Pflanzen des Ökotyp Columbia, die sich nach der Blühinduktion nahezu nicht veränderte. Diese Ergebnisse deuten an, dass sowohl LAS, als auch LEAFY für die erhöhte Expression von *RAX1* nach der Blühinduktion benötigt werden.

Diese Resultate wurden durch Wiederholung des Experiments mit neu generierten Pflanzenproben teilweise bestätigt (Abb. 3-22 D). Pflanzen des Ökotyp Columbia, *las* und *lfy* Einzelmutanten zeigten die bereits beobachtete Erhöhung der *RAX1* Transkription nach der Blühinduktion, wobei *lfy* Mutanten eine stärkere *RAX1* Aktivierung zeigten als zuvor beobachtet (Abb. 3-22 D). *las lfy* Doppelmutanten ließen bei der Wiederholung des Experiments in vegetativen Proben um ~50% niedrigere Transkript-Level des Myb-Transkriptionsfaktors erkennen, und in reproduktiven Proben eine leicht erhöhte Expression von *RAX1*, die in vorherigen Experimenten nicht ermittelt werden konnte (Abb. 3-22 C und D). Im Gegensatz zu Daten des vorherigen Experiments deuteten diese Ergebnisse an, dass die *RAX1* Expression in *las lfy* Doppelmutanten nach der Blühinduktion, wenn auch nicht in gleichem Maße wie in Columbia, verstärkt wird.

Hier soll angeführt werden, dass sich die Datengrundlage bei diesen Experimenten in Abhängigkeit des verwendeten Referenzgens ergibt. Dieses sollte, gerade für „*boundary*“ Gene mit schmalen und streng definierten Expressionsdomänen, ein konstantes und ähnliches Expressionsmuster zu dem zu untersuchenden Gen aufweisen. Eine hohe Variabilität zwischen biologischen Replikaten kann dadurch eventuell verhindert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für den genetischen Hintergrund der *las* Mutante kein solches Gen mit einer ähnlichen Expressionsdomäne identifiziert werden. Da *lfy* Mutanten außerdem steril sind, wurde durchgehend mit einer segregierenden Population gearbeitet, die die Genotypisierung aller verwendeten *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten erforderte. Aus diesem Grund sind für die *RAX1* Expression zwei unabhängige Experimente dargestellt.

4. Diskussion

4.1. Die Kartierung von *FRIGIDA* als Verzweigungsregulator

In der vorliegenden Arbeit sollte unter Anwendung eines sog. „*second-site modifier screen*“ die Identifizierung und Charakterisierung neuer Verzweigungsregulatoren erfolgen, die in alternativ oder parallel arbeitenden Stoffwechselwegen zu *LAS* wirken. Hierfür wurde die *las* Mutante im Ökotyp Columbia mit sechs genetisch verschiedenen Ökotypen gekreuzt und die F2 Nachkommenschaft auf Verstärker und Revertanten des *las* Phänotyps untersucht. Interessanterweise konnte in fünf der sechs betrachteten Populationen ein verstärkter *las* Verzweigungsdefekt beobachtet werden und homozygote *las* F2-Pflanzen zeigten neben dem beschriebenen *las* Phänotyp in Rosettenblattachsen, auch einen Seitentriebdefekt in Achseln von Stängelblättern (Abb. 3-3). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung von Greb *et al.*, dass die Funktion von *LAS* essentiell ist für die Anlage axillärer Meristeme während der vegetativen Entwicklungsphase, und dass der Funktionsverlust von *LAS* bis zum heutigen Kenntnisstand durch keinen anderen genetischen Faktor aufgehoben werden kann.

Die stärksten Verzweigungsdefekte konnten in den Kreuzungspopulationen der *las* Mutante mit den Ökotypen Shahdara, Kyoto und C24 beobachtet werden (Abb. 3-3). Dabei folgte die Seitentriebbildung nach der Blühinduktion stets einem basipetalen Gradienten und Defekte in der Anlage von Lateralmeristemen konnten hauptsächlich in den ältesten Stängelblattachsen beobachtet werden (Abb. 3-3; 3-4). Phänotypische Charakterisierungen dieser Populationen unter kontinuierlichen Langtagbedingungen zeigten, dass der durch Shahdara verursachte Verzweigungsdefekt abhängig ist vom Wachstum unter Kurztagbedingungen, wohingegen die Seitentriebdefekte in Populationen mit Kyoto und C24 nahezu unabhängig von der Tageslänge zur Ausprägung kamen (Abb. 3-4). Dennoch verstärkte das Wachstum unter kurzen Photoperioden den Verzweigungsdefekt in Stängelblattachsen der Kreuzungsnachkommen von *las*/C24 und *las*/Kyo (Abb. 3-3). Die phänotypische Charakterisierung der BC1F1 Population von F2-Kandidatenpflanzen der Kreuzungen *las*/Kyo und *las*/C24, zeigte zusätzlich eine Kosegregation des ermittelten Verzweigungsdefekts mit einem späten Blühzeitpunktphänotyp in Langtagbedingungen (Abb. 3-5). In allen Kreuzungspopulationen der drei verwendeten Ökotypen konnte somit

eine Korrelation zwischen einer langen vegetativen Wachstumsphase und einem Seitentriebdefekt in Stängelblattachsen beobachtet werden. Da sich der Verzweigungsdefekt in Kreuzungspopulationen der *las* Mutante mit Kyoto und C24, sowie dessen Ausprägung in langen Photoperioden sehr ähnelten, wird angenommen, dass in diesen Populationen die gleichen genetischen Faktoren dem Phänotyp zugrunde liegen.

Pflanzen der Kreuzung *las/C24* zeigten in allen Experimenten die stärkste Ausprägung des Verzweigungsdefekts und die generierte BC1F2 Rückkreuzungspopulation diente der Grobkartierung unter Verwendung des *SNPtile1 tiling* Arrays (Abb. 3-7; 3-8). Die Feinkartierung des verantwortlichen Locus identifizierte im oberen Bereich des kurzen Arms auf Chromosom IV fünf Kandidatengene in einer 13kb Region. Aufgrund der beschriebenen Funktionen ist anzunehmen, dass die vier genannten Gene At4G00651, At4g00660, At4G00670 und At4G00680 nicht für die Ausprägung des Verzweigungsdefekts in Pflanzen der Population *las/C24* verantwortlich sind und dass das vielversprechendste Kandidatengen At4G00650, welches für *FRIGIDA* codiert, den Seitentriebdefekt in Nachkommen der Kreuzung *las/C24* verursacht (siehe Kapitel 3.1.5). Aktive *FRI* Allele sind dominant und führen zu einem verzögerten Blühzeitpunkt. Dabei ist die Ausprägung der verzögerten Blühinduktion abhängig von aktiven Allelen des floralen Repressors *FLC*. Für den Ökotyp Columbia konnte gezeigt werden, dass das im Genom vorhandene *fri* Allel nicht funktionell ist, wohingegen das *FLC* Allel funktionsfähig ist (Tab. 3-3; Abb. 3-12). Unter den zur Kreuzung verwendeten Ökotypen besitzen Shahdara, Kyoto und C24 als einzige der benutzten Wildtypen aktive *FRI* Allele (Tab. 3-4) und phänotypische Charakterisierung der zugehörigen Kreuzungspopulationen mit der *las* Mutante zeigten unter allen Kreuzungen die stärksten Verzweigungsdefekte (Abb. 3-3). Literaturrecherchen ergaben, dass das *FLC* Allel in Shahdara nicht funktionsfähig ist, wohingegen C24 und Kyoto schwache *FLC* Allele tragen (Tab. 3-4) und einen leicht späteren Blühzeitpunkt als Columbia aufweisen (Abb. 3-13; Sanda and Amasino, 1995; Shibaïke *et al.*, 1999). Individuen der Population *las/C24* zeigten unter allen Wachstumsbedingungen die stärksten Seitentriebdefekte und Salomé *et al.* nahmen an, dass der Ökotyp C24 ein funktionelles *FLC* Allel trägt, dessen Ausprägung jedoch durch einen zusätzlichen, genetischen Faktor verhindert wird. Es ist vorstellbar, dass der gemischte genetische Hintergrund der *las* Mutante (Col) und C24, in Nachkommen dieser Kreuzung zu einem additiven Effekt führt, wodurch die Initiation axillärer Meristeme stärker unterdrückt wird als in Populationen mit anderen genetischen Konstitutionen. So ist

beispielsweise nach Shibaïke *et al.* das *FLC* Allel aus Kyoto vergleichbar mit dem Allel aus C24 und dennoch zeigen F2-Nachkommen der Kreuzung *las*/Kyo in Langtagbedingungen einen leicht schwächeren Verzweigungsdefekt als Pflanzen der Population *las*/C24 (Abb. 3-4), obwohl in beiden Populationen das aktive *FLC* (Col-0) Allel, sowie das aktive *FRI* (C24; Kyo) Allel segregieren.

In BC3F2 Populationen die zur Feinkartierung verwendet wurden zeigte sich eine Abweichung des ursprünglich ermittelten, basipetalen Gradienten der Seitentriebbildung und die Anlage axillärer Meristeme war in diesen Populationen nicht mehr ausschließlich in den ältesten Stängelblattachsen unterdrückt, sondern auch in Blattachsen nahe dem IM (Abb. 3-9). Der basipetale Gradient könnte durch einen genetischen Faktor kontrolliert worden sein, der in den F2 Populationen dieser 3. Rückkreuzung nun nicht mehr segregiert und in inaktiver Form vorliegt. Hierfür in Frage kommt z.B. der von Salomé *et al.* postulierte Faktor, der im Ökotyp C24 die Ausprägung des *FLC* Allels kontrolliert. Ebenso wäre ein bereits bekannter oder auch ein unbekannter Verzweigungsregulator denkbar, der durch mutante oder schwache Allele aus dem Hintergrund C24 die phänotypische Ausprägung des Verzweigungsdefekts beeinflusst. Dies würde auch die abweichenden Phänotypen einiger, zur Feinkartierung benutzter BC3F2 Rekombinanten erklären (Abb. 3-10*; 3-11 A*). Einen Hinweis darauf gibt auch die durchgeführte Marker-Analyse am Locus *FRI* in BC1F2 Pflanzen, welche für die Grobkartierung verwendet wurden (Tab. 3-5). Hierbei konnte eine starke Tendenz, aber keine 100%ige Kosegregation des aktiven *FRI* Allels aus C24 mit dem verstärkten *las* Verzweigungsdefekt festgestellt werden.

Die Literaturrecherche ergab für den Ökotyp Shahdara ein inaktives *FLC* Allel, sowie ein aktives *FRI* Allel. Nachkommen der Kreuzung *las*/Sha zeigten einen Seitentriebdefekt in Stängelblattachsen in Abhängigkeit von kurzen Photoperioden (Abb. 3-3; 3-4). In dieser Population sollte der dominante Blühzeitpunktregulator *FRIGIDA* nicht für den verstärkten *las* Verzweigungsdefekt verantwortlich sein, da durch Segregation der beiden Loci *FRI* (Sha) und *FLC* (Col) ungefähr ein Viertel der Population unter Langtagbedingungen einen Verzweigungsdefekt hätten zeigen müssen. Eine lange vegetative Phase unter Kurztagbedingungen wird durch eine Verzögerung des Blühzeitpunkts, aufgrund der Instabilität des CO Proteins verursacht. In der bestehenden Literatur wird die Ausprägung einiger Verzweigungsdefekte, wie in *rax1 rax2 rax3* Dreifachmutanten oder *rox* Einzelmutanten, in Abhängigkeit von kurzen Photoperioden bereits beschrieben (siehe

Kapitel 1.4.2; Müller *et al.*, 2006; Yang, 2007; Raatz, 2009). Der Blühzeitpunkt höherer Pflanzen wird unter Kurztagbedingungen alternativ durch den hormonabhängige Stoffwechselweg reguliert (Srikanth and Schmid, 2011). Dabei akkumuliert das Pflanzenhormon GA im Apex und aktiviert ab einem gewissen Schwellenwert die Blütenmeristem-Identitätsgene *LFY* und *SOC1* (Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009; Eriksson *et al.*, 2006). Es wurde bereits vermutet, dass erhöhte GA-Level im Apex, und damit auch im Bereich der Blattachsel, die Zelldifferenzierung fördern und dadurch die Initiation axillärer Meristeme verhindern (Müller, 2005). So zeigen *rax1-2* Mutanten, die eine gestörte Anlage von Lateralmeristemen in Rosetten- und Stängelblattachsen aufweisen, stark erhöhte Level des aktiven GA₄ während der vegetativen Entwicklung, wobei die Ausprägung des Phänotyps in Kurztagbedingungen verstärkt wird (Keller *et al.*, 2006).

Einer der ersten Nachweise in Langtagbedingungen für eine Korrelation zwischen einem spätblühenden Phänotyp und einem Defekt in der Anlage von Lateralmeristemen in *Arabidopsis*, wurde von Kalinina *et al.* erbracht. Untersuchungen des Ökotyp Zürich (Zu-0) zeigten einen Verzweigungsdefekt in Rosetten- und Stängelblattachsen, sowie einen spätblühenden Phänotyp, der durch Interaktion dominanter *FRI* und *FLC* Allele vermittelt wird (Kalinina *et al.*, 2002). Weitere Studien konnten nachweisen, dass durch Vernalisation sowohl der spätblühende Phänotyp, als auch der Verzweigungsdefekt vollständig reprimiert werden. Pflanzen der Linie *FRI* im Ökotyp Columbia die sechs Wochen in kurzen, und anschließenden langen Photoperioden wuchsen, ließen außerdem einen Seitentriebdefekt in älteren Rosettenblattachsen erkennen (Raatz, 2009). Diese Daten unterstützen die durchgeführte Genkartierung des verstärkten *las* Verzweigungsdefekts in Pflanzen der Kreuzung *las/C24* und zeigen, dass *FRIGIDA* in Kombination mit aktiven *FLC* Allelen in der Lage ist, die Anlage axillärer Meristeme zu unterdrücken.

Wang *et al.* konnten kürzlich in *Arabis alpina*, einer mehrjährigen und artverwandten Pflanze zu *Arabidopsis thaliana*, die Beteiligung des *FLC*-Homologs *PERPETUAL FLOWERING 1 (PEP1)* im Prozess der Seitentriebbildung zeigen (Wang *et al.*, 2009). Während in *Arabidopsis thaliana* die *FLC* Expression während der Vernalisation durch Chromatinmodifikationen stabil unterdrückt wird (Jarillo and Pineiro, 2011), steigen die Transkript-Level von *PEP1* nach der Vernalisation auf ein gleiches Maß an wie vor dem

Wachstum in kalten Temperaturen (Wang *et al.*, 2009). Die Instabilität der *PEPI* Reprimierung nach der Vernalisation führt dazu, dass nicht alle angelegten, vegetativen Lateralmeristeme eine reproduktive Identität annehmen, sondern einen vegetativen Charakter beibehalten und so die Seitentriebbildung in der nächsten Blühperiode gewährleisten. Dabei ist *PEPI* vor der Vernalisation nicht nur im Hauptmeristem und in den Blättern exprimiert, sondern auch in axillären Meristemen. Um zu prüfen, ob der MADS-Box Transkriptionsfaktor *FLC* auch in *Arabidopsis* einen reprimierenden Einfluss auf die Anlage von Lateralmeristemen ausüben kann, sollte die Wirkung der *FLC* Expression unter dem *LAS* Promotor in Blattachsen untersucht werden. Wenn florale Repressoren wie *FLC* die Entwicklung von Lateralmeristemen negativ beeinträchtigen, könnten Blühzeitpunktregulatoren, welche einen fördernden Einfluss auf die Blühinduktion besitzen, die Entwicklung axillärer Meristeme positiv beeinflussen. Um diesen Gedankengang zu überprüfen, sollte neben *FLC* auch die Expression des AGAMOUS-ähnlichen Transkriptionsfaktor *SOCI* unter dem *LAS* Promotor getestet werden. Entsprechende Genkonstrukte wurden durch Agrobakterium-vermittelte Transformation in Pflanzen des Ökotyps Columbia und in die *las* Mutante eingeführt. Die Analyse der transgenen Linie war zum Zeitpunkt dieser Arbeit leider noch nicht möglich.

Zusätzlich zu den Ergebnissen von Wang *et al.* zeigen Doppelmutanten in *Arabidopsis* der Gene *EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2)* und *VERNALIZATION2 (VRN2)*, deren Proteine nach der Vernalisation für repressive Chromatinmodifikationen am *FLC* Locus zuständig sind (Jarillo and Pineiro, 2011), einen Verzweigungsdefekt in jungen Rosetten-, und älteren Stängelblattachsen (Raatz, 2009). Weitere Analysen sind notwendig, um die Beteiligung dieser Gene hinsichtlich der Anlage von Lateralmeristemen zu untersuchen.

4.2. Der Einfluss der Blühzeitpunktregulatoren *FRIGIDA* und *CONSTANS* auf die Anlage axillärer Meristeme

Zur Überprüfung der Genkartierung und um den Einfluss von *FRIGIDA* im Prozess der Seitentriebbildung während der reproduktiven Phase zu untersuchen, wurde die *las FRI* Linie auf die Anlage von Seitentrieben in Stängelblattachsen analysiert. Unter kontinuierlichen Langtagbedingungen zeigten *las FRI* Pflanzen, wie auch Pflanzen der elterlichen Linie *FRI* in Columbia, nahezu keine Defekte in der Anlage von

Lateralmeristemen (Abb. 3-14). Dieses Ergebnis war überraschend, da die Genkartierung des verstärkten *las* Verzweigungsdefekts in Pflanzen der Kreuzungspopulation *las/C24*, *FRIGIDA* als bestmöglichen Kandidaten identifizierte. Die Interaktion der beiden funktionellen Loci *FRI* und *FLC* im Hintergrund der *las* Mutante zeigt, dass eine lange vegetative Wachstumsphase der Pflanzen *per se*, verursacht durch einen verzögerten Blühzeitpunkt in Langtagbedingungen, nicht zu einer gestörten Anlage von Lateralmeristemen führt. Dieses Ergebnis konnte durch die phänotypische Charakterisierung der *las co* Doppelmutante bestätigt werden, die ebenso wie Pflanzen der Linie *las FRI*, keinen verstärkten *las* Verzweigungsdefekt in Stängelblattachsen nach der Blühinduktion aufweist (Abb. 3-16). Die phänotypische Charakterisierung von Pflanzen der Linien *las FRI* und *las co* ließ keine Interaktion der Blühzeitpunktregulatoren *CONSTANS* oder *FRIGIDA* mit *LAS* vermuten.

In homozygoten Nachkommen beider Kreuzungen war jedoch auffällig, dass teilweise Individuen auftraten, die einen leichten Seitentriebdefekt in Blattachsen des Haupttriebs zeigten (Abb. 3-14; 3-16). Analysen von *las co* Doppelmutanten ließen dabei einen Defekt in Abhängigkeit des Wachstumsmonats erkennen. So bildeten Pflanzen die im Monat April in langen Photoperioden im Gewächshaus wuchsen weniger Seitentriebe aus Stängelblattachsen, als Pflanzen die in den Wintermonaten Dezember und Januar angezogen wurden (Abb. 3-16). Da die Gewächshausbedingungen bezüglich der Temperatur, der Tageslänge, des Nährstoff- und Wasserangebots kontrolliert werden, könnte der beobachtete Defekt vom steigenden Anteil des natürlichen Tageslichts im Frühjahr abhängig sein. Dies könnte auch die Variabilität des verstärkten *las* Verzweigungsdefekts in BC3F2 Populationen der Kreuzung *las/C24* erklären. Die zweifache Aussaat dieser Population im Wachstumsmonat Dezember mit einem Abstand von drei Wochen, zeigte unter Gewächshausbedingungen in der späteren Population einen schwächeren Seitentriebdefekt als zuvor beobachtet (Abb. 3-9). Studien der *las eol5* Doppelmutante ließen in Abhängigkeit unterschiedlicher Wachstumskammern eine ähnliche Variabilität des Seitentriebdefekts in Stängelblattachsen erkennen (Raatz, 2009). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Ausprägung des Verzweigungsdefekts durch Faktoren wie Lichtqualität und -quantität, Temperatur und Luftfeuchtigkeit beeinflusst wird. Die Funktion des R2R3 Myb-Transkriptionsfaktors *RAX2* wird in Abhängigkeit der Lichtqualität reguliert und könnte einen Einfluss auf die Variabilität des Verzweigungsdefekts in Abhängigkeit des Wachstumsmonats besitzen.

Die Autoren Hong *et al.* zeigten, dass RAX2 (Myb38; auch benannt als *BIT1=Blue Insensitive Trait1*) unter Blaulicht durch den Cryptochrom Photorezeptor CRYPTOCHROME1 (CRY1) stabilisiert wird (Hong *et al.*, 2008). Die Interaktion von RAX2 mit CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1), einer E3 Ubiquitin Ligase die unter anderem für die Regulation der Blühzeitpunktregulatoren *CONSTANS* und *GIGANTEA (GI)* notwendig ist (Imaizumi, 2011), führt in Dunkelheit zur proteolytischen Degradation von RAX2. Der Einfluss der Lichtqualität auf die Funktion von RAX2 wurde bislang nicht in Zusammenhang mit dem Prozess der Seitentriebbildung untersucht. Da für die *rax2* Mutante ein Verzweigungsdefekt nur in Kombination mit Mutationen in *rax1* oder *rax3* beschrieben wurde, sollte die Seitentriebentwicklung in *rax2* Einzelmutanten in Abhängigkeit verschiedener Wellenlängen untersucht werden.

Im Gegensatz zur *las FRI* Linie ließen Pflanzen mit der genetischen Konstitution *las rax1 FRI*, eine nahezu vollständige Unterdrückung der Seitentriebbildung in Langtagbedingungen erkennen (Abb. 3-15). Dabei besaßen die wenigen, in Stängelblattachsen angelegten Lateralmeristeme häufig keine reproduktive, sondern eine florale Identität, so dass die Bildung von Blüten anstelle von Seitentrieben in Blattachsen zu erkennen war (Abb. 3-16). Dieser Phänotyp wurde bereits für die *las rax1* Doppelmutante beschrieben (Müller *et al.*, 2006). Der durch *FRIGIDA* verstärkte *las* Verzweigungsdefekt in Stängelblattachsen der *las rax1 FRI* Linie deutet darauf hin, dass *FRIGIDA* einen regulatorischen Einfluss im Prozess der Seitentriebentwicklung besitzt und redundant zu den Verzweigungsregulatoren *LAS* und *RAX1* wirkt.

Die Analyse der Seitentriebbildung in *las rax1 co* Dreifachmutanten (Abb. 3-17) sollte klären, ob der durch *FRIGIDA* vermittelte Defekt direkt oder indirekt, durch in Abhängigkeit zu *FRI* und *CO* stehende, weitere Faktoren verursacht wird. Die phänotypische Charakterisierung der Dreifachmutante *las rax1 co* zeigte den gleichen verstärkten *las* Verzweigungsdefekt wie Pflanzen der Linie *las rax1 FRI* und ließ ebenfalls die Bildung von Blüten anstelle von Seitentrieben erkennen. Mutationen in *CONSTANS* und funktionelle *FRIGIDA* Allele führen zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Seitentriebbildung in *las rax1* Doppelmutanten und besitzen somit während der reproduktiven Entwicklung den gleichen Einfluss im Stoffwechselweg zur Anlage von Lateralmeristemen. Obwohl in der Kartierung *FRIGIDA* als bestmöglicher Kandidat identifiziert wurde, zeigt der Phänotyp der *las rax1 co* Dreifachmutante, dass der Defekt in *las rax1 FRI* nicht durch eine direkte Interaktion von *FRIGIDA* mit einem

Verzweigungsregulator vermittelt werden kann. Vielmehr ist der verstärkte *las* Verzweigungsdefekt die Auswirkung eines genetischen Blühzeitpunktfaktors, dessen Regulation in gleichem Maße durch aktive *FRIGIDA* Allele, sowie Mutationen in *CONSTANS* beeinflusst wird.

4.3. *LEAFY* besitzt eine Funktion bei der Anlage axilläre Meristeme während der reproduktiven Entwicklung

Die phänotypische Charakterisierung der *lfy* Einzelmutante zeigte in Kurztagbedingungen eine defekte Anlage von Lateralmeristemen nach der Blühinduktion in den oberen beiden Dritteln des Haupttriebs (Abb. 3-18). Dahingegen war die Anlage axillärer Meristeme in den ältesten Stängelblattachsen nicht beeinträchtigt. Die Analyse der *lfy* Einzelmutante zeigt, dass der Transkriptionsfaktor *LEAFY* einen regulatorischen Einfluss im Prozess der Seitentriebbildung besitzt. Dabei fördert *LEAFY* während der reproduktiven Entwicklung in einer späteren Phase, die Bildung von Lateralmeristemen in Achseln von Stängelblättern. Diese Schlussfolgerung kann durch Arbeiten von Kanrar *et al.* gestützt werden, die kürzlich als dritte Funktion für *LEAFY*, neben der Aktivität als *floral integrator* Gen und als Blütenmeristem-Identitätsgen, die Stimulierung meristematischen Wachstums beschrieben (Kaufmann *et al.*, 2010; Irish, 2010; Kanrar *et al.*, 2008). Dabei zeigten Doppelmutanten der BEL1-ähnlichen Homöobox Gene *PENNYWISE* (*PNY*) und *POUND-FOOLISH* (*PNF*), Defekte in der Anlage axillärer Meristeme in Stängelblattachsen, die gemäß den Autoren auf die fehlende Expression der Gene *LEAFY* und *FT* zurückgeführt wurden. Die normale Bildung von Seitentrieben in den ältesten Stängelblattachsen von *lfy* Einzelmutanten, lässt dagegen die zusätzliche Aktivität redundanter Faktoren vermuten. Möglich ist hier die Aktivität von *LAS* oder *RAX1*, deren Expression auch in Blattachsen während der reproduktiven Entwicklung gezeigt wurde (Greb *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2006).

Der durch Mutationen in *lfy* verstärkte *las* Seitentriebdefekt in *las lfy* Doppelmutanten wurde bereits beschrieben (Clarenz, 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Seitentriebanalyse von *las lfy* Doppelmutanten konnte zusätzlich einen zonalen Defekt entlang der Sprossachse nach der Blühinduktion aufdecken (Abb. 3-18). Dabei war die Seitentriebbildung überwiegend in Stängelblattachsen im mittleren Bereich des

Haupttriebs gestört, wohingegen die Initiation axillärer Meristeme in den jüngsten Achseln nicht betroffen war. Der verstärkte Verzweigungsdefekt in *las lfy* Doppelmutanten zeigt, dass *LAS* und *LFY* während der reproduktiven Phase die Bildung von Achselmeristemen durch zwei Stoffwechselwege redundant kontrollieren.

Die Funktion von *LAS* im Prozess der Bildung lateraler Meristeme zeigt sich in erster Linie durch einen Defekt in Achseln von Rosettenblättern, wohingegen *LAS* nach der Blühinduktion für die Bildung von Seitentrieben aus Stängelblattachseln nicht essentiell ist (Greb *et al.*, 2003). Der Vergleich des Seitentriebdefekts in Stängelblattachseln von *lfy* Einzel- und *las lfy* Doppelmutanten lässt die Vermutung zu, dass die Funktion von *LAS* während der reproduktiven Entwicklung zur Bildung von Lateralmeristemen relativ lange aufrechterhalten wird, da die jüngsten Blattachseln nahe dem SAM keinen Defekt zeigen. Hierfür muss die Anlage von Lateralmeristemen während der reproduktiven Entwicklung durch eine Reihe weiterer Faktoren reguliert werden, deren überlappende Funktion entlang der Sprossachse die Ausprägung des Seitentriebdefekts in Stängelblattachseln von *las* Einzelmutanten kompensieren.

Die qRT-PCR-Analyse der Gene *LAS* und *RAX1* zeigte, dass die Expression dieser Verzweigungsregulatoren nach der Blühinduktion hochreguliert wird (Abb. 3-22). Dabei ist die erhöhte Expression von *LAS* und *RAX1* nach der Blühinduktion abhängig von *LEAFY*. Da bei vorherigen Experimenten ausschließlich *las rax1 FRI* und *las rax1 co* Dreifachmutanten ein von *las* abweichendes Verzweigungsmuster zeigten, wird angenommen, dass der verstärkte *las* Verzweigungsdefekt in Pflanzen dieser Linien, durch die *constans* und *FRI* verzögerte Aktivierung von *LEAFY* und den Verzweigungsregulatoren *LAS* und *RAX1* zu Stande kommt. Die positive Regulation von *RAX1* muss jedoch zusätzlich durch mindestens einen weiteren Faktor kontrolliert werden, da nach der Blühinduktion in *lfy* Mutanten eine leichte Erhöhung der *RAX1* Expression verzeichnet werden konnte. Möglich ist hier die Aktivität von *LAS*, da in *las* Mutanten die *RAX1* Expression nach der Blühinduktion ebenfalls nur leicht erhöht war, im Vergleich zu Pflanzen des Ökotyp Columbia.

4.4. *RAX1* definiert die adaxialen und abaxialen Grenzbereiche des Blütenmeristems

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkript-Akkumulation von *RAX1* mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierungen in reproduktiven Apices untersucht. Es wurde gezeigt, dass *RAX1* Transkripte in mehreren Stadien der Blütenentwicklung in unterschiedlichen Expressionsdomänen akkumulieren (Abb. 3-20). Dabei markiert die Expression des R2R3 Myb-Transkriptionsfaktors zu einem frühen Zeitpunkt des ersten Blütenstadiums, ausschließlich den primordialen Bereich der das Blütenmeristem bildet. In der späteren Phase des ersten Stadiums wird die *RAX1* Expression auf die adaxiale und abaxiale Grenzregion zwischen dem IM und dem Blütenmeristem, sowie dem Blütenmeristem und der Region des Hochblatts reduziert. Long und Barton zeigten durch die Expression der Gene *ANT* und *STM*, dass dieser Bereich des Blütenprimordiums Blattidentität besitzt und keine meristematische Aktivität aufweist. Die morphologische Abgrenzung des Blütenmeristems zu dem *ANT*-definierten Blattbereich, konnte durch Arbeiten von Kwiatkowska (2006) deutlich gemacht werden. Rasterelektronen-mikroskopische Aufnahmen und 3D-Modelle zur Zellteilung zeigten, dass sich das Blütenmeristem durch eine flache Falte/Achsel von dem Bereich abgrenzt der nach Long und Barton Blattidentität besitzt. Die durchgeführten *in-situ*-Hybridisierungen lassen die *RAX1* Transkript-Akkumulation in genau diesem Grenzbereich erkennen. Basierend auf den vorliegenden Daten definiert der R2R3 Myb-Transkriptionsfaktor *RAX1* die Bildung des Blütenmeristems, durch dessen Abgrenzung vom IM und dem in *Arabidopsis* reduzierten Hochblatt. Die Arbeiten von Busch *et al.* (2011) konnten diese „boundary“ Funktion kürzlich auch für die zu *RAX1* orthologen Gene *Blind* und *Potato leaf* aus Tomate nachweisen. Die Aktivität dieser Gene in definierten Grenzregionen ist notwendig für die Bildung von Lateralmeristemen in Blattachsen, wie auch für die Bildung von Blattfiedern am zusammengesetzten Blatt von Tomate.

Obwohl für die *rax1* Einzelmutante, sowie die *rax1 rax2 rax3* Dreifachmutante bislang kein Blütendefekt beschrieben wurde, konnte die Expression dieser Gene in Blüten gezeigt werden (Müller *et al.*, 2006). Die Funktion der *rax* Gene bei der Blütenbildung wird durch Pflanzen der *RAX2* Überexpressionslinie deutlich, die einen Defekt bei der Blütenentwicklung besitzen. Die Blütenbildung in *rax* Mutanten wird vermutlich durch redundante Faktoren reguliert. Dabei trägt die Expression von *LAS* in den Achseln von

Sepalen, Petalen und Karpellen, zur Separierung von Blütenorganen bei (Greb *et al.*, 2003; Raatz, 2009). Studien der *las-11 fil-8* Doppelmutante zeigten außerdem, dass *las-11* den Blütendefekt der *fil-8* Mutante verstärkt (Goldshmidt *et al.*, 2008). Das Allel *fil-8* besitzt einen Defekt im Gen *YABI*, welches im Blütenprimordium ähnlich wie *ANT* im Blattbereich exprimiert ist. Da die Expression der Gene *RAX1* und *LAS* nach der Blühinduktion von der Aktivität des Blühzeitpunktregulators *LFY* abhängig ist, wird angenommen, dass *LFY* die Blütenmeristem-Identität und die Separierung von Blütenorganen durch Regulation von *LAS* und *RAX1* kontrolliert. Die Blütendefekte in *lfy* Mutanten sind möglicherweise eine Auswirkung der Fehlregulation von *RAX1* und *LAS*.

Die spezifische *RAX1* Expression im Achselbereich zwischen dem Blütenmeristem und dem *ANT*-definierten Blattbereich des Primordiums war im zweiten Blütenstadium nicht mehr sichtbar. In diesem Stadium konnte ebenfalls keine *ANT* Expression im abaxialen Bereich des Primordiums mehr nachgewiesen werden (Long and Barton, 2000), und *RAX1* Transkripte akkumulierten ausschließlich im adaxialen Bereich zwischen dem IM und dem Blütenprimordium. Die *YABI* Expression war, im Gegensatz zu der Expression von *ANT*, auch noch im Blattbereich des dritten Blütenstadiums deutlich erkennbar (Goldshmidt *et al.*, 2008). Analysen von Goldshmidt *et al.* lassen vermuten, dass *YABI* ein nicht-zellautonomes Signal aus dem Blatt vermittelt, das über *LAS* die Positionierung der Blattachsel und dadurch die Grenze zwischen dem meristematischen Zellbereich des SAM und dem Primordium in der peripheren Zone bestimmt (Goldshmidt *et al.*, 2008; Barton, 2010). Kürzlich wurde eine Interaktion zwischen *RAX1* und *YAB1* in einem Hefe-zwei-Hybrid-System nachgewiesen (Yang, 2007). Es ist denkbar, dass die Interaktion von *RAX1* und *YAB1* die Expressionsdomäne von *RAX1* definiert und dadurch die Abgrenzung des Blütenmeristems vom IM und dem abaxialen Bereich des Primordiums bestimmt, ähnlich wie die Positionierung der Blattachsel durch *YABI* über *LAS*.

4.5. Blühzeitpunktregulatoren kontrollieren die Anlage axillärer Meristeme durch Regulation von *LAS* und *RAX1* während der reproduktiven Entwicklung

In *Arabidopsis* wird die Initiation axillärer Meristeme entlang der Sprossachse durch zwei, partiell redundant wirkende Stoffwechselwege reguliert (Müller *et al.*, 2006). Dies erfolgt zum einen während der vegetativen Entwicklungsphase durch den transkriptionellen Regulator *LAS* und zum anderen, während der vegetativen und frühen reproduktiven Phase, durch redundante Wirkung der R2R3 Myb-Transkriptionsfaktoren *RAX1*, *RAX2* und *RAX3* (Greb *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2006). Die Initiation von Lateralmeristemen während der reproduktiven Entwicklung, wird zusätzlich in einem dritten Stoffwechselweg durch die Aktivität von Blühzeitpunktregulatoren kontrolliert. Dieser Stoffwechselweg wirkt über den Transkriptionsfaktor *LEAFY* zur Blühinduktion und die zeitlich verzögerte Aktivierung dessen, führt zu Seitentriebdefekten in Achseln von Stängelblättern. Die zeitgleiche Inaktivierung aller drei Stoffwechselwege, wie beispielsweise in *las rax1 co* Dreifachmutanten, hat den nahezu vollständigen Verlust axillärer Meristeme entlang der Sprossachse zur Folge. *LEAFY* reguliert hierbei positiv die Expression des Transkriptionsfaktors *RAX1* und Moyroud *et al.* (2011) konnten kürzlich durch ChIP-Seq Experimente (Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung), eine direkte Bindung von *LEAFY* an *cis*-regulatorische Bereiche von *RAX1* und *RAX2* nachweisen. Zusätzlich zu der positiven Regulation durch *LEAFY*, wird die *RAX1* Expression indirekt durch den Blühzeitpunktregulator *API* reprimiert (Kaufmann *et al.*, 2010 A), der wiederum indirekt die Aktivität von *LEAFY* positiv reguliert (Irish, 2010). Basierend auf den vorliegenden Daten kontrollieren *LEAFY* und *APETALA1* die Initiation axillärer Meristeme und die Bildung von Blütenmeristemen durch antagonistische Regulation von *RAX1*. Die Interaktion von *LAS* muss hierbei noch ermittelt werden, da *LAS* nach der Blühinduktion die Separierung von Organen, sowie die Initiation axillärer Meristeme durch die eigene Expression in einem positiven *feedback loop*, in Abhängigkeit eines noch nicht identifizierten Blühzeitpunktregulators reguliert.

5. Literaturverzeichnis

- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., 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, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brodgen, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Amasino, R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant Journal* 62: 1001-1013.
- Applied Biosystems (2001) User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System.
- Atwell, S., Huang, Y.S., Vilhjálmsson, B.J., Willems, G., Horton, M., Li, Y., Meng, D., Platt, A., Tarone, A.M., Hu, T.T., Jiang, R., Mulyati, N.W., Zhang, X., Amer, M.A., Baxter, I., Brachi, B., Chory, J., Dean, C., Debieu, M., de Meaux, J., Ecker, J.R., Faure, N., Kniskern, J.M., Jones, J.D.G., Todd, M., Nemri, A., Roux, F., Salt, D.E., Tang, C., Todesco, M., Traw, M.B., Weigel, D., Marjoram, P., Borevitz, J.O., Bergelson, J., and Nordborg, M. (2010). Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* 465: 627-631.
- Barton, M.K. (2010). Twenty years on: The inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Developmental Biology* 341: 95-113.
- Becker, A., Chau, D.-Y., Zhang, X., Salt, D.E., and Baxter, I. (2011). Bulk Segregant Analysis Using Single Nucleotide Polymorphism Microarrays. *PLoS ONE* 6(1): e15993.doi:10.1371/journal.pone.0015993
- Bellaoui, M., Pidkowich, M.S., Samach, A., Kushalappa, K. (2001). The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE Homeodomain Proteins Interact through a Domain Conserved between Plants and Animals. *Plant Cell* 13: 2455-2470.
- Blázquez, M.A., Ahn, J.H., and Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 33: 168-171.
- Borevitz, J. (2006). Genotyping and Mapping With High-Density Oligonucleotide Arrays. *Methods in Molecular Biology* 323, II, 137-145.
- Borevitz, J.O., Liang, D., Plouffe, D., Chang, H.S., Zhu, T., Weigel, D., Berry, C.C., Winzeler, E., and Chory, J. (2003). Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes. *Genome Res.* 13: 513-523.
- Busch, B.L., Schmitz, G., Rossmann, S., Piron, F., Ding, J., Bendahmane, A., and Theres, K. (2011). Shoot Branching and Leaf Dissection in Tomato Are Regulated by Homologous Gene Modules. *Plant Cell* (in press), PMID 22039213.
- Caicedo, A.L., Stinchcombe, J.R., Olsen, K.M., Schmitt, J., and Purugganan, M.D. (2004). Epistatic interaction between *Arabidopsis FRI* and *FLC* flowering time genes generate a latitudinal cline in life history trait. *Proc Natl Acad Sci* 101: 15670-15675.
- Choi, K., Kim, J., Hwang, H.-J., Kim, S., Park, C., and Kim, S.Y. (2011). The FRIGIDA Complex Activates Transcription of *FLC*, a Strong Flowering Repressor in *Arabidopsis*, by Recruiting Chromatin Modification Factors. *Plant Cell* 23: 289-303.
- Clarenz, O. (2004). Studien zur Rolle des LATERAL SUPPRESSOR Gens bei der Initiation von Achselmeristemen: Analyse von Doppelmutanten und Charakterisierung von Modifikatoren des *las-4* Phänotyps. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

- Clark, R.M., Schweikert, G., Toomajian, C., Ossowski, S., Zeller, G., Shinn, P., Warthmann, N., Hu, T.T., Fu, G., Hinds, D.A., Chen, H., Frazer, K.A., Huson, D.H., Schölkopf, B., Nordborg, M., Rättsch, G., Ecker, J.R., and Weigel, D. (2007). Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 317 (5836): 338-342.
- Coen, E.S., Romero, J.M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G., and Carpenter, R. (1990). *floricaula*: A Homeotic Gene Required for Flower Development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311-1322.
- Cole, M., Nolte, C., and Werr, W. (2006). Nuclear import of the transcription factor SHOOT MERISTEMLESS depends on heterodimerization with BLH proteins expressed in discrete subdomains of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 34: 1281-1292.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.-R. (2005). Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 5-17.
- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C.A., Taylor, J.M., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (2011). Flowering Locus C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. *PNAS* 108: 6680-6685.
- Eriksson, S., Böhlenius, H., Moritz, T., and Nilsson, O. (2006). GA4 Is the Active Gibberellin in the Regulation of *LEAFY* Transcription and *Arabidopsis* Floral Initiation. *Plant Cell* 18: 2172-2181.
- Gazzani, S., Gendall, A.R., Lister, C., and Dean, C. (2003). Analysis of the Molecular Basis of Flowering Time Variation in *Arabidopsis* Accessions. *Plant Physiology* 132: 1107-1114.
- Geraldo, N., Bäurle, I., Kidou, S.-I., Hu, X., and Dean, C. (2009). FRGIDA Delays Flowering in *Arabidopsis* via a Cotranscriptional Mechanism Involving Direct Interaction with the Nuclear Cap-Binding Complex. *Plant Physiology* 150: 1611-1618.
- Goldshmidt, A., Alvarez, J.P., Bowman, J.L., and Eshed, Y. (2008). Signals Derived from *YABBY* Gene Activities in Organ Primordia Regulate Growth and Partitioning of *Arabidopsis* Shoot Apical Meristems. *Plant Cell* 20: 1217-1230.
- Grbic, V., and Bleeker, A.B. (1996). An altered body plan is conferred on *Arabidopsis* plants carrying dominant alleles of two genes. *Development* 122: 2395-2403.
- Greb, T., Clarenz, O., Schäfer, E., Müller, D., Herrero, R., Schmitz, G., and Theres, K. (2003). Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved mechanism for axillary meristem formation. *Genes and Development* 17: 1175-1187.
- Groot, S.P.C., Keizer, L.C.P., De Ruiter, W., and Dons, J.J.M. (1994). Seed and fruit set of the lateral suppressor mutant of tomato. *Sci. Horti.* 59: 157-162.
- Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H., and Huijser, P. (2000). Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 21: 351-36.
- He, Yuehui (2009). Control of the Transition to Flowering by Chromatin Modifications. *Molecular Plant* 2: 554-564.
- Hempel, F.D., and Feldman, L.J. (1994). Bi-directional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*: Acropetal initiation of flowers and basipetal initiation of paraclades. *Planta* 192 (2): 276-286.
- Henderson, I.R., and Dean, C. (2004). Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development* 131: 3829-3838.
- Hong, S.H., Kim, H.J., Ryu, J.S., Choi, H., Jeong, S., Shin, J., Choi, G., and Nam, H.G. (2008). CRY1 inhibits COP1-mediated degradation of BIT1, a MYB transcription factor, to activate blue light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 55: 361-371.

- Huang, T.-S., Wei, T., Laliberté, J.-F., and Wang, A. (2010). A Host RNA Helicase-Like Protein, AtRH8, Interacts with Potyviral Genome Linked Protein, VPg, Associates with the Virus Accumulation Complex, and is Essential for Infection. *Plant Physiology* 152: 255-266.
- Huang, X., Paulo, M.-J., Boer, M., Effgen, S., Keizer, P., Koornneef, M., and van Eeuwijk, F.A. (2011). Analysis of natural allelic variation in *Arabidopsis* using a multiparent recombinant inbred line population. *Proc Natl Acad Sci* 108: 4488-4493.
- Huijser, P., and Schmid, M. (2011). The control of development phase transition in plants. *Development* 138: 4117-4129.
- Imaizumi, T. (2011). *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Current Opinion Plant Biology* 13: 83-89.
- Irish, V.F. (2010). The flowering of *Arabidopsis* flower development. *Plant Journal* 61: 1014-1028.
- Jarillo, J.A., and Pineiro, M. (2011). Timing is everything in plant development. The central role of floral repressors. *Plant Science* 181: 364-378.
- Jarsch, I.K., and Ott, T. (2010). Perspectives on Remorin Proteins, Membrane Rafts, and Their Role During Plant-Microbe Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 7-12.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., and Dean, C. (2000). Molecular Analysis of *FRIGIDA*, a Major Determinant of Natural Variation in *Arabidopsis* Flowering Time. *Science* 290: 344-347.
- Kalinina, A., Mihajlovic, N., and Grbic, V. (2002). Axillary meristem development in the branchless *Zu-0* ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215: 699-707.
- Kandasamy, M.K., Burgos-Rivera, B., McKinney, E.C., Ruzicka, D.R., and Meagher, R.B. (2007). Class-Specific Interaction of Profilin and ADF Isovariants with Actin in the Regulation of Plant Development. *Plant Cell* 19: 3111-3126.
- Kanrar, S., Bhattacharya, M., Arthur, B., Courtier, J., and Smith, H.M.S. (2008). Regulatory networks that function to specify flower meristems require the function of homeobox genes *PENNYWISE* and *POUND-FOOLISH* in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 54: 924-937.
- Kaufmann, K., Pajoro, A., and Angenent, G.C. (2010). Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nature Reviews Genetics* 11: 830-842.
- Kaufmann, K., Wellmer, F., Muino, J.M., Ferrier, T., Wuest, S.E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueno, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E.M., Angenent, G.C., and Riechmann, J.L. (2010 A). Orchestration of Floral Initiation of *APETALA1*. *Science* 328: 85-89.
- Keller, T., Abbott, J., Moritz, T., and Doerner, P. (2006). *Arabidopsis* *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMI* Controls a Leaf Axil Stem Cell Niche and Modulates Vegetative Development. *Plant Cell* 18: 598-611.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., and Vreugdenhil, D. (2004). Naturally Occurring Genetic Variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 141-172.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M., and Soppe, W. (1998). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 345-370.
- Kwiatkowska, D. (2006). Flower primordium formation at the *Arabidopsis* shoot apex: quantitative analysis of surface geometry and growth. *Journal Experimental Botany* 57: 571-580.

- Laubinger, S., Marchal, V., Le Gourrierec, Wenkel, S., Adrian, J., Jang, S., Kulajta, C., Braun, H., Coupland, G., and Hoecker, U. (2006). *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* 133: 3213-3222.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., and Jürgens, G. (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122: 87-96.
- Lee, J., and Lee, I. (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal Experimental Botany* 61: 2247-2254.
- Lee, J.H., Lee, J.S., and Ahn, J.H. (2008). Ambient Temperature Signaling in Plants: An Emerging Field in the Regulation of Flowering Time. *Journal Plant Biology* 51: 321-326.
- Long, J., and Barton, M.K. (2000). Initiation of Axillary and Floral Meristems in *Arabidopsis*. *Developmental Biology* 218: 341-353.
- McSteen, P., and Leyser, O. (2005). Shoot Branching. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 353-374.
- Michaels, S.D. (2009). Flowering time regulation produces much fruit. *Current Opinion Plant Biology* 12: 75-80.
- Michaels, S.D., and Amasino, R. (1999). *FLOWERING LOCUS C* Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. *Plant Cell* 11: 949-956.
- Michaels, S.D., Himelblau, E., Kim, S.Y., Schomburg, F.M., and Amasino, R.M. (2005). Integration of Flowering Signals in Winter-Annual *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137: 149-156.
- Miwa, H., Kinoshita, A., Fukuda, H., and Sawa, S. (2009). Plant meristems: CLAVATA3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. *Journal Plant Res.* 122: 31-39.
- Moyroud, E., Minguet, E.G., Ott, F., Yant, L., Posé, D., Monniaux, M., Blanchet, S., Bastien, O., Thévenon, E., Weigel, D., Schmid, M., and Parcy, F. (2011). Prediction of Regulatory Interactions from Genome Sequences Using a Biophysical Model for the *Arabidopsis* LEAFY Transcription Factor. *Plant Cell* 23: 1293-1306.
- Müller, D. (2005). Studien zur Rolle von *Blind*-homologen Myb-Genen bei der Anlage von Achselmeristemen in *Arabidopsis thaliana*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der 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.
- Mutasa-Göttgens, E., and Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal Experimental Botany* 60: 1979-1989.
- Neff, M.M., Turk, E., and Kalishman, M. (2002). Web-based Primer Design for Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Trends Genetics* 18: 613-615.
- Page, D.R., and Grossniklaus, U. (2002). THE ART AND DESIGN OF GENETIC SCREENS: *ARABIDOPSIS THALIANA*. *Nature Reviews Genetics* 3: 124-136.
- Paulo, M.-J., Boer, M., Huang, X., Koornneef, M., and van Eeuwijk, F. (2008). A mixed model QTL for complex cross population consisting of a half diallel of two-way hybrids in *Arabidopsis thaliana*: analysis of simulated data. *Euphytica* 161: 107-114.
- Pluthero, F.G. (1993). Rapid purification of high-activity *Taq* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 21 (20): 4850-4851.

- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., and 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.
- R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0; <http://www.r-project.org>.
- Raatz, B. (2009). Characterization of the *LATERAL SUPPRESSOR* Promoter and the New Regulator of Axillary Meristem Formation *ENHANCER OF LATERAL SUPPRESSOR 5*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Raffaele, S., Mongrand, S., Gamas, P., Niebel, A., and Ott, T. (2007). Genome-Wide Annotation of Remorins, a Plant-Specific Protein Family: Evolutionary and Functional Perspectives. *Plant Physiology* 145: 593-600.
- Raman, S., Greb, T., Peaucelle, A., Blein, T., Laufs, P., and Theres, K. (2008). Interplay of miR164, *CUP-SHAPED COTELYDON* genes and *LATERAL SUPPRESSOR* controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 55: 65-76.
- Reiser, L., Sánchez-Baracaldo, P., and Hake, S. (2000). Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of *knox* homeobox genes. *Plant Molecular Biology* 42: 151-166.
- Reymond, P., Kunz, B., Paul-Pletzer, K., Grimm, R., Eckerskron, C., and Farmer, E.E. (1996). Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant Cell* 8: 2265-2276.
- Rieu, I., and Laux, T. (2009). Signaling pathways maintaining stem cells at the plant shoot apex. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20: 1083-1088.
- Robson, F., Costa, M.M.R., Hepworth, S.R., Vizir, I., Pineiro, M., Reeves, P.H., Putterill, J., and Coupland, G. (2001). Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant Journal* 28: 619-631.
- Rozen, S., and Skaletsky, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365-386.
- Rutjens, B., Bao, D., van Eck-Stouten, E., Brand, M., Smeeckens, S., and Proveniers, M. (2009). Shoot apical meristem function in *Arabidopsis* requires the combined activities of three *BEL1*-like homeodomain proteins. *Plant Journal* 58: 641-654.
- Sablowski, R. (2007). Flowering and determinancy in *Arabidopsis*. *Journal Exp. Botany* 58: 899-907.
- Salomé, P.A., Bomblies, K., Laitinen, R.A.E., Yant, L., Mott, R., and Weigel, D. (2011). Genetic architecture of flowering time variation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 10.1534/genetics.111.126607.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanda, S.L., and Amasino, R.M. (1995). Genetic and physiological analysis of flowering time in the C24 line of *Arabidopsis thaliana*. *Weeds World* 2: 2-8.
- Schmitz, G. and Theres, K. (2005). Shoot and inflorescence branching. *Current Opinion Plant Biology* 8: 506-511.
- Schoof, H., Lenhard M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, 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: 635-644.

- Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., and Theres, K. (1999). The *Lateral suppressor* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 290-295.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A., and Coupland, G. (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 20: 898-912.
- Sheldon, C.C., Rouse, D.T., Finnegan, E.J., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (2000). The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *PNAS* 97: 3759-3764.
- Shibaike, H., Ishihuri, Y., and Kawano, S. (1999) Genetic analysis of flowering time for eight natural populations of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) in Japan with special regard to the genes, *FRI* and *FLC*. *Plant Species Biology* 14: 229-236.
- Shindo, C., Bernasconi, G., and Hardtke, C.S. (2007). Natural Genetic Variation in *Arabidopsis*: Tools, Traits and Prospects for Evolutionary Ecology. *Annals of Botany* 99: 1043-1054.
- Simpson, G.G., and Dean, C. (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta Stone of Flowering Time? *Science* 296: 285-289.
- Smith, H.M.S., Ung, N., and Courtier, J. (2011). Specification of reproductive meristems require the combined functions of SHOOT MERISTEMLESS and floral intergrators FLOWERING LOCUS T and FD during *Arabidopsis* inflorescence development. *Journal Exp. Botany* 62: 583-593.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 755-767.
- Srikanth, A., and Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell Mol Life Sci* 68: 2013-2037.
- Steeves, T.A., and Sussex, I.M. (1989). *Patterns in Plant Development*. New York: Cambridge University Press, 895-905.
- Stirnberg, P., Chatfield, S.P., and Leyser, H.M.O. (1999) *AXRI* acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 121 (3): 839-847.
- Stirnberg, P., van De Sande, K., and Leyser, H.M.O. (2002) *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* 129 (5): 1131-1141.
- Sussex, I.M., and Kerk, N.M. (2001). The evolution of plant architecture. *Curr Opin Plant Biol* 4: 33-37
- Takano, S., Niihama, M., Smith, H.M.S., Tasaka, M., Aida, M. (2010). *gorgon*, a Novel Missense Mutation in the *SHOOT MERISTEMLESS* Gene, Impairs Shoot Meristem Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 51: 621-634.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS* 98: 5116-5121.
- Ung, N., Lal, S., and Smith, H.M.S. (2011). The Role of PENNYWISE and POUND-FOOLISH in the Maintenance of the Shoot Apical Meristem in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156: 605-614.
- Wang, R., Farrona, S., Vincent, C., Joecker, A., Schoof, H., Turck, F., Alonso-Blanco, C., Coupland, G., and Albani, M. (2009). *PEPI* regulates perennial flowering in *Arabis alpina*. *Nature* 459: 423-427.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., und Meyerowitz, E.M. (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69: 843-859.
- Wellmer, F., and Riechmann, J.L. (2010). Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends in Genetics* 26: 519-527.

- Wigge, P.A. (2011). FT, A Mobile Developmental Signal in Plants. *Current Biology* 21: R374-R378.
- Yan, Z., Liang, D., Liu, H., and Zheng, G. (2010). *FLC*: A Key Regulator of Flowering Time in *Arabidopsis*. *Russian Journal Plant Physiology* 57: 166-174.
- Yang, F. (2007). Identification and characterization of interactors of *RAX1* controlling shoot branching in *Arabidopsis thaliana*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Zeller, G., Clark, R.M., Schneeberger, K., Bohlen, A., Weigel, D., and Ratsch, G. (2008). Detecting Polymorphic Regions in the *Arabidopsis thaliana* Genome with Resequencing Microarrays. *Genome Res.* 18: 918-929.
- Zhang, X., and Borevitz, J.O. (2009). Global Analysis of Allele-Specific Expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 182: 943-954.
- Zhu, Q.-H., and Helliwell, C.A. (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *Journal Experimental Botany* 62: 487-495.

Zusammenfassung

Die Sprossarchitektur höherer Pflanzen wird hauptsächlich durch die Aktivität des Sprossapikalmeristems (SAM) festgelegt. Dieses bestimmt während der pflanzlichen Entwicklung die Bildung von Blättern entlang der Sprossachse und die Initiation lateraler Meristeme (AM) in Achseln der Blätter, zur Bildung sekundärer Wachstumsachsen. Die Initiation axillärer Meristeme wird in *Arabidopsis* durch zwei, partiell redundante Stoffwechselwege über die Gene *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)* und *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEM (RAX)* reguliert. Dabei ist die Funktion von *LAS* essentiell für die Anlage von AMs während der vegetativen Entwicklung und *las* Mutanten bilden keine Seitentriebe aus Rosettenblattachsen. Zur Identifizierung neuer Verzweigungsregulation wurde die natürlich vorkommende, genetische Variation verschiedener *Arabidopsis* Ökotypen in einem sogenannten „*second-site modifier screen*“ genutzt. Hierfür wurde die *las* Mutante im Ökotyp Columbia zu sechs verschiedenen Ökotypen gekreuzt und die *las* homozygoten F2 Nachkommenschaften phänotypisch charakterisiert. In fünf der sechs F2 Populationen konnte ein verstärkter *las* Verzweigungsdefekt in Stängelblattachsen ermittelt werden und ausgewählte F2 Kandidaten wurden für Rückkreuzungen mit dem *las* Elter verwendet. Die Analyse der segregierenden BC1F1 Populationen zeigte eine Korrelation zwischen dem verstärkten *las* Verzweigungsdefekt und einem spätblühenden Phänotyp, insbesondere in Populationen aus Kreuzungen mit den Ökotypen Kyoto und C24. Nachkommen der Kreuzung *las/C24* zeigten insgesamt die stärksten Defekte in der Anlage von Lateralmeristemen und wurden für weitere Analysen verwendet. Die Grobkartierung des verantwortlichen Locus unter Verwendung eines *AtSNPtile1* Array, sowie die weitere Feinkartierung in BC3F2 Populationen, identifizierte fünf Kandidatengene in einer 13kb Region im oberen Bereich des kurzen Arms auf Chromosom IV und beinhaltete den dominanten Blühzeitpunktregulator *FRIGIDA (FRI)*.

In *Arabidopsis* wird die Regulation des Blühzeitpunkts maßgeblich durch die Interaktion der Regulatoren *FLOWERING LOCUS C* und *FRI* beeinflusst, wobei *FRI* positiv die Expression von *FLC* reguliert und dadurch die Blühinduktion vor der Vernalisation verhindert. Im Columbia Hintergrund der *las* Mutante ist diese Interaktion unterdrückt, da Columbia nur ein aktives *FLC*, jedoch ein inaktives *FRI* Allel trägt. Um den Einfluss von *FRI* auf die Anlage von Lateralmeristemen zu untersuchen, wurden *las* und *las rax1*

Mutanten zu der Linie *FRI* (SF-2) in Columbia gekreuzt, die aktive *FRI* Allele aus dem Ökotyp San Feliu-2 besitzt. Homozygote Nachkommen der Kreuzung zeigten kein von *las* abweichendes Verzweigungsmuster. Die verzögerte Blühinduktion durch Interaktion von *FRI* und *FLC per se* ist somit nicht für einen Verzweigungsdefekt während der reproduktiven Entwicklung verantwortlich. Pflanzen der Linie *las rax1 FRI* hingegen zeigten eine nahezu vollständige Unterdrückung der Initiation axillärer Meristeme entlang der Sprossachse. Für weitere Analysen wurden *las* und *las rax1* Mutanten zusätzlich zu mutanten Allelen der Blühzeitpunktregulatoren *constans* und *leafy* gekreuzt. Mutationen in *CONSTANS* führten zu keinem veränderten Verzweigungsmuster der *las* Mutante, wohingegen *las rax1 co* Dreifachmutanten die gleichen Defekte in der Anlage von Lateralmeristemen widerspiegelten wie Pflanzen der Linie *las rax1 FRI*. Im Gegensatz zu Pflanzen der Mutanten *las FRI* und *las co*, ließen *las lfy* Doppelmutanten eine enorme Verstärkung des *las* Verzweigungsdefekts in Stängelblattachsen während der reproduktiven Entwicklung erkennen (siehe auch Clarenz, 2004). RNA-*in-situ*-Hybridisierungen und quantitative Real-Time-PCR Analysen des R2R3 Myb-Transkriptionsfaktors *RAX1* zeigten, dass die erhöhte *RAX1* Expression nach der Blühinduktion abhängig ist von der Funktion des Transkriptionsfaktors *LEAFY*. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Initiation axillärer Meristeme während der reproduktiven Entwicklung durch einen dritten Stoffwechselweg reguliert wird, welcher durch die Aktivität von Blühzeitpunktregulatoren wie *FRIGIDA*, über *LEAFY* die Aktivität von Verzweigungsregulatoren wie *RAX1* und *LAS* steuert.

Abstract

The aerial architecture of higher plants is mainly determined by the activity of the shoot apical meristem (SAM), which controls the formation of leaves and the initiation of axillary meristems (AM) in axils of newly formed leaf primordia. In *Arabidopsis*, two partially redundant pathways are described for the initiation of AMs mediated through functions of *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)* and *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEM FORMATION (RAX)*. The function of *LAS* is essential for AM initiation during vegetative development and *las* mutants in *Arabidopsis* lack side shoot formation in rosette leaf axils. To identify new shoot branching regulators involved in the process of axillary meristem formation, a second-site modifier screen was used. Therefore, the *las* mutant in the Columbia background was crossed to six different naturally occurring *A. thaliana* wild accessions. Five out of six *las* homozygous F2 populations displayed an enhanced *las* branching defect after floral transition in the axils of cauline leaves, and enhancer candidates were backcrossed to the *las* mutant parent. In the segregating BC1F1 populations, a correlation was found between the enhanced *las* branching defect and a late flowering phenotype, especially in combinations with the accessions Kyoto (Kyo) and C24. Populations of *las/C24* showed the most striking branching defects and were further analyzed. Rough mapping of the gene responsible for the enhanced *las* branching defect was performed on an *AtSNPtile1* array using a BC1F2 population. Fine mapping of BC3F2 populations identified five candidate genes in a 13kb region at the top of chromosome IV, including the dominant flowering time regulator *FRIGIDA (FRI)*.

In *Arabidopsis*, flowering time is mainly controlled by the genetic interaction of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* and *FRI*, in which *FRI* positively controls *FLC* expression resulting in inhibition of flowering before vernalization. The *las* mutant in the Columbia background carries an active *FLC*, but an inactive *fri* allele. To investigate the influence of *FRI* on AM formation, *las* single and *las rax1* double mutants were crossed to *FRI* (SF-2) in Columbia, which carries an active *FRI* allele of the ecotype San Feliu-2. The interaction of active *FRI* and active *FLC* alleles in the *las* mutant background did not lead to an altered *las* branching pattern in *las FRI* plants, showing that “late flowering” *per se* is not sufficient to cause defects in AM initiation during reproductive development. In contrast to plants homozygous for *las FRI*, the line *las rax1 FRI* displayed an almost complete loss of AM formation in the growing shoot. To obtain a better understanding of the role of

flowering time regulators in the process of AM formation, *las* single and *las rax1* double mutants were additionally combined with mutant alleles of the flowering time genes *CONSTANS (CO)* and *LEAFY (LFY)*. The *constans* mutation had no effect on AM formation in the background of *las*, whereas the triple mutant *las rax1 co* phenocopied the branching defect of *las rax1 FRI* plants. In contrast to *las FRI* and *las co* plants, the double mutant *las lfy* displayed a strong enhancement of the *las* branching defect in cauline leaf axils during reproductive development (see also Clarenz, 2004). Studies on transcript accumulation of *RAX1* using RNA *in situ* hybridization and quantitative real-time PCR experiments showed that upregulation of *RAX1* after floral transition is dependent on *LEAFY* function. In summary, these findings suggest a regulation of axillary meristem initiation during reproductive development by a third pathway, which is controlled by flowering time regulators that act through the transcription factor *LEAFY* on branching regulators such as *RAX1* and *LAS*.

Danksagung

*Ohne die stete Unterstützung von vielen Seiten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.
Mein herzlicher Dank gilt...*

Prof Dr. Klaus Theres, für die Möglichkeit diese Arbeit am MPIPZ durchzuführen, sowie die stete Unterstützung und hilfreiche Diskussionen in den letzten Jahren

Prof. Dr. Maarten Koornneef, für das große Interesse an dieser Arbeit, sowie für hilfreiche Diskussionen und Anregungen

Prof. Dr. Wolfgang Werr, für die Übernahme des Zweigutachtens und Prof. Dr. Martin Hülskamp, für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes

Dr. Bruno Hüttel und Dr. Fei He für Hilfe und Unterstützung des Array Experiments

den fleißigen Gärtner, insbesondere Heike, den Mitarbeitern von SUSAN und ADIS, und Frau Maret-Linda Kalda für die Photographien der vielen, vielen Pflanzen

Mike Quadbeck, für die Motivase und sein unsägliches Talent den Laborbetrieb durch „fast orders“ am Leben zu halten

I'd like to thank my group for the great atmosphere – special thanks to Susanne, Anna and Quan – for helpful discussions and many funny moments in the lab, 7 days per week

Ursula und Alexandra, für die Hilfe und den Spaß im Labor, sowie ihr organisatorisches Talent das Labor täglich vor dem Chaos zu bewahren

Nora - ich danke dir von Herzen

Kerstin und Carina – danke – für die vielen schönen Momente und Erinnerungen

Der größte Dank gebührt meiner Familie - ohne Euch wäre es nicht möglich gewesen

Karin, Christian, Marion und Mel...

... meiner gesamten Familie, die nie aufhörte zu fragen wann ich endlich fertig werde

Tobias - für deine Unterstützung und dein Verständnis, deinen Humor und dein Herz ...

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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, 05.12.2011

Barbara Nicole Schäfer