



Hochschule für Angewandte  
Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

**Fakultät Life Science**

**Genexpressionsstudie ausgewählter Blüten- und  
Dormanzgene in Pappeln (*Populus tremula* L.)**

**Bachelorarbeit  
im Studiengang Biotechnologie**

vorgelegt von  
Maïke Paulini

Gutachter:

Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker

Dr. rer. nat. Hans Hönicka

Abgabe: 26.07.2012

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, allen zu danken, die mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Claus-Dieter Wacker und Herrn Dr. rer. nat. Hans Hönicka, die mir als meine Betreuer stets mit Rat und Tat zu Seite standen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Denise Lehnhardt bedanken, die mir bei Fragen immer hilfsbereit zur Seite stand.

Frau Dr. rer.nat. Birte Pakull danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Johann Heinrich von Thünen Institut-Institut für Forstgenetik bedanken.

Torsten Drewes danke ich für die Unterstützung die er mir geboten hat.

Meinen Eltern gilt mein besonderer Dank, da ohne ihre Unterstützung die sie mir geboten haben, weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	5
<b>1. Einleitung</b> .....	6
1.1 Zielsetzung dieser Arbeit.....	6
1.2 Biologie der untersuchten Art.....	7
1.2.1 Die Gattung <i>Populus</i> .....	7
1.2.2 <i>Populus</i> als Objekt in Forschung und Züchtung .....	8
1.3 Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge bei Pflanzen .....	9
1.3.1 Entwicklungsphasen bei Pflanzen .....	9
1.3.2 Blüteninitiierung und Blüteninduktion in Pflanzen.....	11
1.3.3 Dormanz in Bäumen.....	15
1.3.4 Genetische Regulierung der Dormanz in der Gattung <i>Populus</i> .....	16
1.3.5 Verbindung zwischen Blütengenen und weiteren Entwicklungsprozessen.....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	19
2.1 Material .....	19
2.1.1 Chemikalien.....	19
2.1.2 Größenstandards.....	19
2.1.3 Kits .....	20
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	20
2.1.5 Enzyme .....	22
2.1.6 Pflanzenmaterial.....	22
2.1.7 Primer.....	22
2.2 Methoden .....	23
2.2.1 Ernte des Pflanzenmaterials.....	23
2.2.2 Analyse von RNA .....	23
2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	23
2.2.2.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	24
2.2.2.3 Degradationskontrolle der RNA am Bioanalyzer .....	26
2.2.2.4 RT-PCR.....	27
2.2.2.4.1 cDNA-Synthese .....	27
2.2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	27
2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	29

---

<b>3. Ergebnisse</b> .....	30
3.1 Expression von Blüten- und Dormanz-Genen.....	30
3.2 Ergebnisse der vorbereitenden Untersuchungen.....	31
3.3 Ergebnisse der Expressionsanalysen .....	32
3.3 Ergebnisse der Expression der untersuchten Blüten- und Dormanzgene.....	35
3.3.1 Expression des Blütengens <i>PtFT1</i> .....	35
3.3.2 Expression des Blütengens <i>PtFT2</i> .....	37
3.3.3 Expression des <i>CO</i> -homologen Gens <i>PtCO2</i> .....	37
3.3.4 Expression des DAM-homologen Gens <i>POPTR_0007s03260.2</i> .....	37
3.3.5 Expression des DAM-homologen Gens <i>POPTR_0007s14310</i> .....	39
<b>4. Diskussion</b> .....	41
4.1 Expression der Blütengene .....	41
4.1.1 Expression von <i>PtFT1</i> .....	41
4.1.2 Expression von <i>PtFT2</i> .....	44
4.1.3 Expression von Gens <i>PtCO2</i> .....	46
4.2 DAM-Gene und ihre Expression .....	46
4.2.1 Expression von <i>POPTR_0007s03260.2</i> .....	47
4.2.2 Expression von <i>POPTR_0007s14310</i> .....	50
4.3 Fazit.....	52
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	53
<b>6. Literatur</b> .....	54
<b>7. Anhang</b> .....	57

## Abkürzungsverzeichnis

### Chemikalien und Lösungen

DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
MgCl <sub>2</sub>	Magenesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
SDS	Natriumdecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan

### Molekularbiologische Abkürzungen und biologische Abkürzungen

cDNA	Complementary DNA	Mb	Megabasen
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	<i>P.</i>	<i>Populus</i>
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PCR	PolymeraseChainReaction /Polymerasekettenreaktion
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	Rev.	Reverse (bei Primern)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	RT PCR	Reverse Transkriptase PCR
dTTP	Desoxythymidintriphosphat		
for.	Forward (bei Primern)		
kb	Kilobase		

### Technische Einheiten und andere Abkürzungen

abs.	absolut (100 %)	μM	Mikromolar
bzgl.	bezüglich	ng	Nanogramm
bzw.	beziehungsweise	nm	Nanometer
°C	Grad Celsius	OD	optische Dichte
ca.	circa	rpm	Umdrehung pro Minute
cm	Zentimeter	sec.	Sekunde
<i>et al.</i>	Und andere	s. o.	siehe oben
g	Gramm	s. u.	siehe unten
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	T <sub>a</sub>	Annealing Temperature
ggf.	gegebenenfalls	Tab.	Tabelle
l	Liter	T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
mg	Milligramm	u. a.	unter anderem / unter anderen
min.	Minute	vgl.	vergleiche
mind.	Mindestens	Vol.	Volumen
ml	Milliliter	v/v	Volumen/Volumen
mm	Millimeter	w/v	Gewicht/Volumen
mM	Millimolar	z. B:	zum Beispiel
mmol	Millimol	%	Prozent
μg	Mikrogramm	∞	unendlich
μl	Mikroliter		

## 1. Einleitung

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Expression von Dormanz- und Blütengenen in transgenen und nicht-transgenen Pappeln (*Populus tremula* L.).

Im Rahmen der Einleitung wird die Gattung *Populus* abgefasst. Anschließend werden Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge bei Pflanzen erläutert, schwerpunktmäßig Blütenentwicklung und Dormanz, und eine Übersicht über die wichtigsten Gene gegeben, die bei diesen Steuerungsprozessen eine Rolle spielen. Zuletzt wird auf die Verbindung einiger Blütengene mit weiteren Entwicklungs- bzw. Differenzierungs-Vorgängen eingegangen.

### 1.1 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit fand im Rahmen eines Projektes der „Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), „Flowering time control: from natural variation to crop improvement“ zur Förderung einer frühen Blüte in der Gattung *Populus* statt.

Wie in der Einleitung bzw. in Kapitel 1.2.2 erwähnt, spielen während der Blütenentwicklung Veränderungen des Expressionsmusters einiger Blüten- und Dormanzgene eine Rolle.

Für die Untersuchungen wurden u. a. transgene Pappeln ausgewählt, bei denen eine Überexpression des Gens *BpMADS4* (*Betula pendula MADS4*) vorliegt. Entgegen Beobachtungen in anderen Pflanzenarten (Birke, Apfel) induziert eine Überexpression dieses Gens in Pappel keine frühe Blüte. Um diese Beobachtungen zu erklären, sollte überprüft werden, ob in den entsprechenden Linien Änderungen in der Aktivität von Blüten-/Dormanzgenen im Vergleich zum Wildtyp vorliegen. Außerdem sollte untersucht werden, ob ggf. ein Zusammenhang mit der in den *BpMADS4*-Linien beobachteten gestörten Winterdormanz und Seneszenz besteht.

## 1.2 Biologie der untersuchten Art

### 1.2.1 Die Gattung *Populus*

Die Gattung *Populus* ist Teil der Familie *Salicaceae* und beinhaltet ca. 30 Arten sommergrüner Bäume und Sträucher, die in sechs Gruppen aufgeteilt werden (Tabelle 1).

Aigeros	Tacamahaca	Leucoides	Turanga	Populus	Abaso
<i>P. nigra</i>	<i>P. trichocarpa</i>	<i>P. lasiocarpa</i>	<i>P. euphratica</i>	<i>P. tremula</i>	<i>P. mexicana</i>
<i>P. deltoides</i>	<i>P. laurifolia</i>	<i>P. glauca</i>	<i>P. pruinosa</i>	<i>P. tremuloides</i>	
<i>P. fremontii</i>	<i>P. balsmifera</i>	<i>P. hetrophylla</i>	<i>P. ilicifolia</i>	<i>P. alba</i>	
	<i>P. angustifolia</i>			<i>P. adenopoda</i>	
	<i>P. laurifolia</i>			<i>P. grandidentata</i>	

**Tabelle 1: Einteilung der Gattung *Populus* in sechs Sektionen**

In den einzelnen Sektionen sind einige Arten-Beispiele aufgeführt (nach Eckenwalder, 1996)

Traditionell erfolgt die Zuordnung der einzelnen Arten zu den sechs Sektionen nach morphologischen sowie reproduktiven Merkmalen und ihrer Kreuzbarkeit. Neben den reinen Arten existiert eine große Anzahl natürlich vorkommender Hybride. Hierbei hybridisieren einzelne Arten der jeweiligen Sektion untereinander. Arten der Sektionen Tacamahaca und Aigeros hybridisieren wechselseitig. Im Gegensatz dazu bilden Arten der Gattung *Populus* keine Hybride mit Arten anderer Sektionen. Aus diesem Grund ist die Abgrenzung einer Art nicht immer eindeutig (Eckenwalder *et al.*, 1996).

Die Verbreitung der verschiedenen Arten der Gattung *Populus* erstreckt sich über ein Gebiet, das weite Teile der nördlichen Hemisphäre einnimmt. Beliebte Wachstumsstandorte sind feuchte Gebiete, wie z. B. an Flussläufen. Industriellen Einsatz finden die verschiedenen Arten der Gattung als Holzproduzent für die Herstellung von u. a. Papier, Verpackungsmaterialien oder Spanplatten. Wegen ihres raschen Wachstums sind diese Pflanzen für den Einsatz auf Kurzumtriebsplantagen zur CO<sub>2</sub>-neutralen Energiegewinnung von Interesse (Bradshaw *et al.*, 2000).

Alle Arten der Gattung, mit Ausnahme von *P. lasiocarpa* Oliv., sind zweihäusig/diözisch, das bedeutet, dass rein männliche sowie rein weibliche Individuen vorkommen. Die Vermehrung erfolgt sexuell, durch Windbestäubung und vegetativ. Bis auf einige auftretende abweichende Individuen sind alle Arten der Gattung *Populus* diploid. Sie besitzen einen haploiden Chromosomensatz von 19

und ein relativ kleines Genom von ca. 480 Megabasen (Mb). Somit ist das Pappelgenom nur ca. 4 x größer als das von *Arabidopsis thaliana* und etwa 40 x kleiner als das Genom vieler Koniferen (Jansson *et al.*, 2007).

### 1.2.2 *Populus* als Objekt in Forschung und Züchtung

Die Gattung *Populus* (Abbildung 1) hat sich aufgrund mehrerer Vorzüge, wie das bereits erwähnte relativ kleine Genom, der schnellen Wachstumsrate, einfacher vegetativer Vermehrung und guter Handhabung bei Gewebekultur- und Transformationsmethoden als Modell für die Forstgenetik etabliert.

Im Jahr 2006 wurde die Genomsequenz des weiblichen *P. trichocarpa*-Baumes Genotyp: „Nisqually 1“ veröffentlicht (Tuskan *et al.*, 2006). Das entschlüsselte Genom ist im Internet auf <http://www.phytozome.net/poplar> frei verfügbar.

Die verschiedenen Arten der Gattung *Populus* dienen als Forschungsobjekte z. B. in Bezug auf Fragen zur Holz- und Blütenbildung und Biosicherheit.

Einige Nachteile, die die Gattung als Modell mit sich bringt, sind die mit 7-12 Jahren relativ langen Generationszeiten und die Zweihäusigkeit, da durch diese eine Selbstung, d. h. eine erzwungene Selbstbefruchtung, bei Pflanzen unmöglich wird.



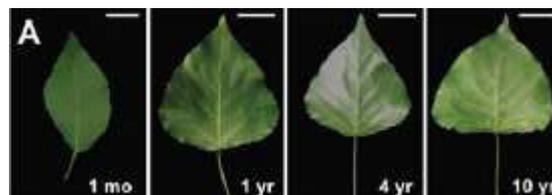
**Abbildung 1: *Populus tremula* L.**

Abgebildet ist *Populus tremula* L. als gesamter Baum (links), die Blätter des Baumes (oben rechts) und die Rinde (unten rechts; Sánchez de Lorenzo-Cáceres, 2001).

## 1.3 Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge bei Pflanzen

### 1.3.1 Entwicklungsphasen bei Pflanzen

Die Entwicklung der Pflanzen gliedert sich in diverse Phasen. Nach der Keimung treten sie in eine juvenile vegetative Phase ein (Wang *et al.*, 2007). Daraufhin folgt der Übergang in eine adulte vegetative Phase bevor die Produktion von reproduktiven Strukturen eingeleitet wird (Wang *et al.* 2007). Während dieser Entwicklungsphasen unterliegen die Pflanzen einiger struktureller und genetischer Änderungen (Wang *et al.*, 2007). Die strukturellen Veränderungen beinhalten morphologische Modifikationen der Blätter (Abbildung 2) und der Apikalmeristeme (Abbildung 3). Der Vorgang der morphologischen Modifikation der Blätter wird als Heteroblastie bezeichnet und ist das Ergebnis einiger sich überschneidender Prozesse (Allsopp, 1967; Goebel, 1900, Wareing, 1959). Anhand des Beispiels in Abbildung 2 wird deutlich, wie umfassend diese Modifikationen sein können.



**Abbildung 2:** Änderung der Blattmorphologie während der Entwicklung von *Populus* (Wang *et al.*, 2010).

Die Maßstabsbalken (oben rechts) entsprechen 2 cm bei dem einen Monat alten Blatt und 4 cm für die folgenden Blätter. Die Blätter einer einen Monate alten Pflanze weisen kleine und schmale Blätter auf, während Blätter von Pflanzen ab einem Alter von einem Jahr deutlich größer erscheinen und eine deltoide Form aufweisen. Diese Blattform bleibt bei den älteren Pflanzen bestehen.

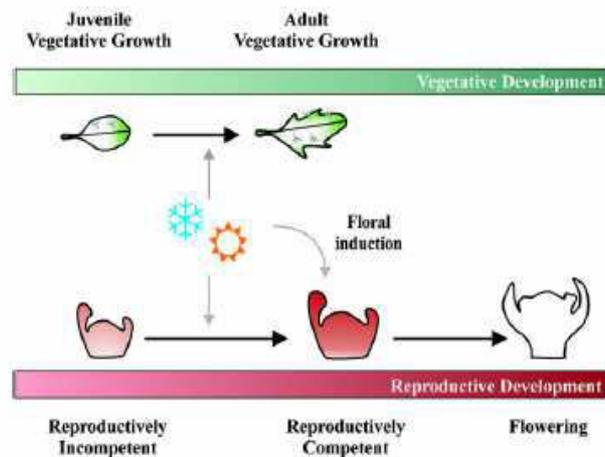
Die Abgrenzung der einzelnen Entwicklungsphasen kann allerdings nicht eindeutig definiert werden, da bei den unterschiedlichen Autoren zu diesem Thema keine Einheitlichkeit besteht. So unterscheiden Hackett (1988) und Meilan (1996) zwei Phasen voneinander. Die erste Lebensphase wird hier als Juvenilität bezeichnet und charakterisiert den Abschnitt des Nichtblühens, während dessen auch mit blüteninduzierenden Maßnahmen kein Blühen erzielt werden kann. Die sich anschließende Phase wird als adulte Phase bezeichnet. Hier wird eine Blühfähigkeit (Reproduktivität) erreicht und es kommt zu unterschiedlichen Änderungen von physiologischen, morphologischen und entwicklungsbezogenen Merkmalen bzw.

Eigenschaften. Die Veränderungen der Eigenschaften können von Art zu Art unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Im Gegensatz dazu erklärt Pierik (1990), dass die Maturität im engen Zusammenhang mit der Blühfähigkeit steht, bestreitet jedoch, dass damit eine Alterung eindeutig definiert werden kann. Diese Behauptung wird mit der Beobachtung erläutert bzw. gestützt, dass einige Koniferen bereits während ihrer Jugendphase blühen. Zudem können auch ökologische Einflüsse die endogenen Entwicklungsabläufe beeinflussen und konvergente Auswirkungen zur Folge haben (Lyr *et al.*, 1992). Diese und einige weitere Aussagen führen dazu, dass die Begriffe „Juvenilität“ und „Maturität“ bisher nicht messbar und damit auch nicht abschließend definiert und erfasst werden können.

Aus diesem Grund wird sich im Folgenden beispielhaft auf die Beschreibung der Entwicklungsphasen von der Modellpflanze *A. thaliana* nach Bergonzi und Albani (2011) beschränkt. Bei der anuellen (einjährigen) Pflanze *A. thaliana* weisen die Blätter, welche während der juvenilen Phase produziert werden, eindeutige morphologische Unterschiede zu jenen auf, die während des adulten-vegetativen Wachstums gebildet werden (siehe Abbildung 2). Das Spitzenmeristem von *A. thaliana* ist in der juvenilen Entwicklungsphase noch nicht empfänglich für Blüten-induzierende Stimulantien. Erst nach dem Übergang in die adulte Phase wird es für diese Art von Stimulantien empfänglich und erfährt hierdurch die Umwandlung von reproduktiv inkompetent zu reproduktiv kompetent (siehe Abbildung 3). Durch endogene und/oder ökologische Faktoren (wie Tageslänge, Temperatur) kann der Übertritt von der juvenilen zur adulten Entwicklungsstufe in Meristem und Blatt beeinflusst bzw. ausgelöst werden (siehe Abbildung 3; Bergonzi und Albani, 2011).

Die juvenile Phase kann bei Forstpflanzen sehr ausgedehnt sein. So kann es mehrere Jahrzehnte dauern, bis sich die erste Blüte entwickelt. Die Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) blüht zum Beispiel das erste Mal nach 30-40 Jahren (Meilan, 1997). Dies stellt für die Pflanzenzüchtung und die biologische Sicherheitsforschung ein schweres Hindernis dar. Aus diesem Grund existiert eine Vielzahl von Projekten, die das Ziel haben, eine frühzeitige Blüte zu induzieren.



**Abbildung 3: Darstellung der morphologischen Änderungen in Blatt und Spitzenmeristem bei *A. thaliana***

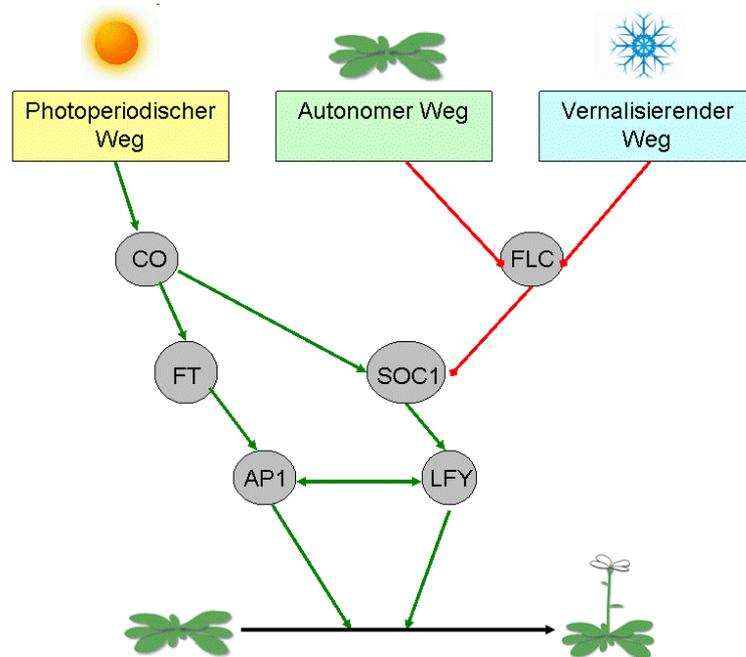
Während ihrer Entwicklung unterliegen Pflanzen mehreren Entwicklungsstufen. Diese Stufen beinhalten Änderungen in der Morphologie und Physiologie von Blättern und Spitzenmeristemen. In *A. thaliana* werden während der frühen Entwicklungsstufe (juveniles vegetatives Wachstum) kleine runde Blätter produziert, während adulte Blätter größer sind und einen gezackten Rand besitzen. Die Entwicklung des Spitzenmeristems ist assoziiert mit der Kompetenz auf Blüten-stimulierende Faktoren zu reagieren. In der frühen Phase der Entwicklung ist das Spitzenmeristem noch nicht für den Empfang Blüten-stimulierender Faktoren ausgerichtet. Nach dem Übergang in die adulte Phase erfährt das Spitzenmeristem den Wechsel in eine Reproduktive Phase. Endogene und ökologische Faktoren können den Wechsel von Blatt und Spitzenmeristem in eine adulte Entwicklungsstufe beeinflussen (graue Pfeile; Bergonzi und Albani, 2011).

### 1.3.2 Blüteninitiierung und Blüteninduktion in Pflanzen

Die Blütenentwicklung wird bei Pflanzen von mehreren Faktoren beeinflusst. So spielen neben äußeren Faktoren (Blüteninitiierung) auch genetische Einflüsse (Blüteninduktion) eine Rolle (Srikanth *et al.*, 2010). Die Gene, welche während der Induktion der Blüte bei der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* eine Rolle spielen, sind u. a. *Flowering Locus T (FT)*, *Flowering Locus C (FLC)*, *LEAFY (LFY)*, *FRUITFUL (FUL)* und *APETALA 1* und *2 (AP1 bzw. AP2)* (Srikanth und Schmid, 2010).

Das Gen *FT* sowie dazu homologe Gene anderer Gattungen spielen bei der Steuerung der Blütenentwicklung eine zentrale Rolle (Kardailsky *et al.*, 1999). *FT* bildet den Schnittpunkt mehrerer Reaktionswege (Abbildung 4), die als Ziel die Induktion der Blüte haben (Srikanth und Schmid, 2010). Bei diesen Wegen handelt es sich zum einen um den sogenannten photoperiodischen Weg. Dabei werden die blüten-induzierenden Signale durch Änderungen in der Dauer der Lichtperiode ausgelöst. Zum anderen handelt es sich um den autonomen Weg. Hier werden die

entsprechenden Signale z. B. durch endogene Hormone ausgelöst. Schließlich kann der vernalisierende Weg auch eine wichtige Rolle spielen.



**Abbildung 4: Schema zur Induzierung einer Blüte in *Arabidopsis thaliana*.**

Der photoperiodische-, autonome bzw. vernalisierende Weg fördert eine Blüte bei Langtag-Bedingungen. Repräsentiert werden sie durch die Gene *FLC* und *CO*. Der autonome- und der vernalisierende Weg wirken durch die Repression von *FLC* unterstützend auf die Induzierung einer Blüte (dargestellt durch die roten Linien). Der photoperiodische Weg wird repräsentiert durch das Gen *CO*. Durch die Expression von *CO* wird die Expression von *FT* und *SOC1* gefördert. Diese fördern ihrerseits die Expression von *AP1* und *LFY* an deren Ende die Induzierung einer Blüte steht (jeweils dargestellt durch die grünen Pfeile; überarbeitete Grafik; Corbesier und Coupland (2006), Reeves und Coupland (2001)).

Die für die Induktion der Blüte nötigen Signale werden hier in Abhängigkeit von einer längeren Kälteperiode und einer bestimmten Tageslänge ausgelöst (Srikanth und Schmid, 2010).

Wenn nun die ökologischen und endogenen Bedingungen für die Ausbildung einer Blüte geeignet sind, setzt sich die Signalkette fort. Bei *Arabidopsis thaliana* aktivieren an dieser Stelle sogenannte „florale Integratoren“, zu denen u. a. die Gene *FLC*, *FT* und *SOC1* (*Suppressor of Overexpression of CONSTANS*) gehören, die Blütenmeristem-Identitätsgene, wie z. B. *LFY* und *AP1* (Srikanth und Schmid, 2010). Die floralen Integratoren sind über mehrere Reaktionswege miteinander verknüpft und unterliegen einer gegenseitigen Regulation. *FLC* zentralisiert die Signale des vernalisierenden und autonomen Weges. Bei *FLC* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, dessen Ausschaltung eine frühe Blüte zur Folge hat. Dies

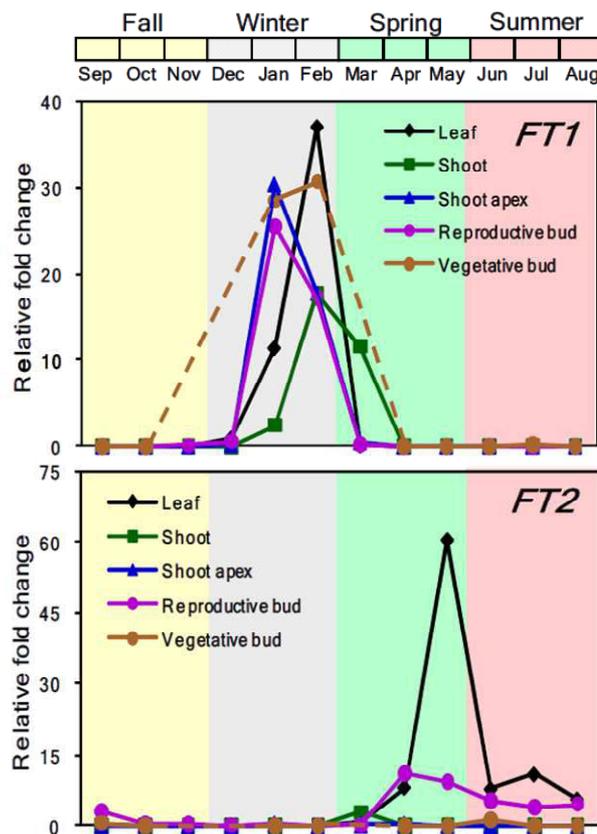
geschieht indem es unter anderem den Blüh-Aktivator *SOC1* hemmt. Das Gen *SOC1* ist ein wichtiger Positivregulator der Blütenmeristem-Entwicklung, der die Signale des vernalisierenden und des photoperiodischen Reaktionswegs empfängt und weiterleitet (Wang, 2007).

Die Aktivierung von *SOC1* wird unter anderem über *CONSTANS (CO)* durch Langtag-Bedingungen (photoperiodischer Weg) gesteuert. Über *FLC* (vernalisierender Weg) erfolgt eine eventuelle Hemmung des Gens *SOC1* (Jack *et al.*, 2004). Eine Aufhebung der Repression durch *FLC* ist für eine Aktivierung von *SOC1* allerdings nicht ausreichend. Es muss eine zusätzliche Aktivierung durch zum Beispiel *CO* erfolgen (Srikanth und Schmid, 2010). Zudem steuert *SOC1* das Gen *FUL*, welches für die Regulierung der Transkription einiger Gene nötig ist, die für die zelluläre Differenzierung während der Blüten- und Blattentwicklung eine wichtige Rolle spielen. *LFY* wird wie *SOC1* unter anderen durch Langtag-Bedingungen aktiviert. Dies geschieht zum Beispiel über *SOC1*. *LFY* fungiert an dieser Stelle als sogenannter Integrator. Das bedeutet, dass es die Signale des photoperiodischen Wegs empfängt und schließlich die Ausbildung von floralen Organen (Blüten) bewirkt. *FT* wird ebenfalls durch Langtag-Bedingungen aktiviert (photoperiodischer Weg) oder durch *FLC* (vernalisierender Weg) unterdrückt. *FT* aktiviert seinerseits *AP1* (Jack *et al.*, 2004).

Letztendlich werden die oben genannten Reaktionswege an den Genen *AP1* und *LFY* zusammengeführt. Die Gene *AP1* und *LFY* bilden bei *Arabidopsis thaliana* somit das Ende der Signalkette. Sie werden auch als Blütenmeristem-Identitätsgene bezeichnet (Srikanth und Schmid, 2010). Sie aktivieren sich gegenseitig. Allerdings wird auch während der Abwesenheit von *LFY* eine Blüte gebildet. Jedoch besitzt die so ausgebildete Blüte eine fehlerhafte Organ-Ausbildung (Paul *et al.*, 2004).

Bei der Gattung *Populus* wurden bisher einige Gene identifiziert, die einen hohen Homologiegrad zu den in *Arabidopsis* vorkommenden Blütengenen aufweisen (Leseberg *et al.*, 2006). Eine Vielzahl der Blütengene aus *Arabidopsis* haben zwei entsprechend homologe Gene in *Populus*. Der Grund hierfür liegt darin, dass einige Gene während der Evolution dupliziert wurden (Leseberg *et al.*, 2006). Das Gen *FT* findet man in Pappel als die homologen Gene *PtFT1* (Böhlenius *et al.*, 2006) und *PtFT2* (Hsu *et al.*, 2006), denen unterschiedliche Aufgaben zukommen und die ein gewebespezifisches Expressionsmuster aufweisen. *PtFT1* wird zu Beginn der

reproduktiven Phase in Abhängigkeit zu kalten Temperaturen (vernalischer Weg) und *PtFT2* bei wärmeren Temperaturen exprimiert. Ein Zusammenspiel beider Gene leitet das vegetative Wachstum und die Knospenbildung an (Hsu *et al.*, 2011; siehe Abbildung 5). Zudem nimmt *PtFT2* die Rolle eines Multistress-Sensors in einem komplexen molekularen Netzwerk ein. Es gibt jedoch Gene, wie zum Beispiel das zu *LFY* homologe Gen *PtLF*, bei denen bis zum heutigen Zeitpunkt keine Verdopplung festzustellen ist (Leseberg *et al.*, 2006). Außerdem gibt es Gene, die bisher nicht eindeutig identifiziert wurden (Leseberg *et al.*, 2006). Dazu gehören zum Beispiel Homologe des in *Arabidopsis* bekannten Gens *FLC*.



**Abbildung 5: Durchschnittliche jährliche Expression von *PtFT1* und *PtFT2* in *P. deltooides*.**

Relative Expressions-Änderung von *PtFT1* (oben) und *PtFT2* (unten) in Blatt, Meristem, Spitzenmeristem, vegetativer Knospe (Blattknospe) und reproduktiver Knospe (Blütenknospe) von *P. deltooides*. Während der Wintermonate (Dezember bis Februar) findet eine starke Expression von *PtFT1* in dem untersuchten Gewebe statt. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *PtFT2* während des Winters minimal bis nicht vorhanden. Das Gen *PtFT2* wird in dem untersuchten Gewebe ausschließlich während der Frühling- und Sommermonate exprimiert (Hsu *et al.*, 2011).

### 1.3.3 Dormanz in Bäumen

Mehrfährige Pflanzen wie z. B. Bäume sind mit einem einzigartigen Mechanismus ausgestattet. Dieser Mechanismus, der durch sensorische Systeme, die die Veränderungen der Umweltbedingungen erfassen und mit den Jahreszeiten synchronisiert ist, erlaubt ein kräftiges Wachstum und die Vermehrung während der Frühling- und Sommermonate, sowie eine Ruhephase während des Winters (Rinne *et al.*, 2010). Durch diese Anpassung werden frühzeitig Abschlussknospen angelegt und eine verbesserte Toleranz der Bäume gegenüber kälteren Temperaturen erzielt (Ko *et al.*, 2010). So können Schäden, ausgelöst durch Frost, vermieden werden (Ko *et al.*, 2010). Die Unfähigkeit zur Initiierung des Wachstums von Meristemen und anderen Organen während der nicht favorisierten Umweltbedingungen wird als Dormanz bezeichnet und unterliegt einer starken genetischen Kontrolle (Rohde und Bahlerao, 2007).

Der Begriff „Dormanz“ deckt ein weites Spektrum eines Phänomens ab, das in verschiedenen pflanzlichen Strukturen wie Samen, Knollen und Knospen zu finden ist. Es existiert eine Vielzahl von allgemeinen und phänologischen Beschreibungen, die allerdings keinen spezifischen Mechanismus zur Dormanz erklären (Rinne *et al.*, 2010). Ein Versuch, eine universelle Terminologie einzuführen, ist die Unterteilung der Dormanz in Para-, Eco- und Endodormanz (Lang *et al.*, 1987). Demnach versteht man unter Ecodormanz das Ausbleiben des Wachstums, ausgelöst durch limitierende Umweltfaktoren, wie zum Beispiel fehlende Nährstoffe oder niedrige Temperaturen. Bei der Endodormanz erfolgt die Inhibierung des Wachstums durch interne Vorgänge innerhalb der Pflanze. Wenn das Ausbleiben jeglichen Wachstums sowohl auf interne als auch externe Faktoren zurückgeführt werden kann, spricht man von Paradormanz. Die Para- und Endodormanz werden im Allgemeinen als „wahre Dormanz“ bezeichnet, da in diesen Fällen das Meristem sowie weitere pflanzliche Strukturen unempfindlich für wachstumsfördernde Signale sind (Rohde und Bahlerao, 2007). Bei der Ecodormanz ist dies nicht der Fall, da hier das Wachstum nach Wiedereinführung der fehlenden Faktoren wiedereinsetzen kann (Rinne *et al.*, 2010).

Die Abgrenzung der Paradormanz von der Endormanz besteht darin, dass der Ort der Rezeption eines ruheinduzierenden Signals nicht zwangsläufig das später ruhende Organ selbst ist (Lang *et al.*, 1987).

### 1.3.4 Genetische Regulierung der Dormanz in der Gattung *Populus*

Die Dormanz und die Entlassung aus der Dormanz unterliegen einer starken genetischen Kontrolle. Welche Gene hierbei eine Rolle spielen und wie sie zueinander in Beziehung stehen, konnte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt werden (Rinne *et al.*, 2010).

Untersuchungen, welche den molekularen und genetischen Ansatz verfolgen, konnten allerdings einige der endogen ablaufenden Prozesse charakterisieren (Yamane *et al.*, 2010). Ein Durchbruch war die Identifikation der *Populus* homologen Gene zu *FT* und *CO* (Rohde und Bahlerao, 2007). Da eine Überexpression des homologen *Populus* Gens *PtFT1* in transgenen Pappeln zum Beispiel dazu führte, dass bei diesen Pflanzen das Wachstum unter Kurztag-Bedingungen nicht zum Erliegen kam (Böhlenius *et al.*, 2006).

Neben *PtFT1* und *PtCO2* existieren eine Reihe weiterer Gene, die bei der Regulierung der Dormanz eine wichtige Rolle spielen. Hierbei handelt es sich um einige der so genannten MADS-Box-Gene, zu denen auch das Gen *FT* bzw. *PtFT1* gehört (Yamane *et al.*, 2010). Bei den MADS-Box-Genen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die in eukaryotischen Organismen genregulatorische Aufgaben erfüllen (Buchanan *et al.*, 2000). Diese Gene besitzen einen konservierten Genabschnitt, der sich während der Evolution nicht verändert hat (Taiz *et al.*, 2000). Somit sind teilweise auch die Sequenzen von Aminosäuren in allen aus ihnen gebildeten Proteinen einheitlich.

Anhand von Untersuchungen der Expressionsmuster mehrerer MADS-Box-Gene in *Euphorvia esula* (Brachwurz) konnte gezeigt werden, dass eine Hochregulation dieser Gene zur Einleitung der Endodormanz erfolgt und eine abnehmende Expression dieser Gene zum Ende der Endodormanz vorliegt (Yamane *et al.*, 2008). Aufgrund dessen erfolgte die Benennung dieser Gene als *DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX (DAM)*-Gene. In der Pflanze *Euphorvia esula* konnten drei *DAM*-Gene und deren Verbindung mit den Genen *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* und *AGAMOUS-LIKE 24* nachgewiesen werden (Horvath *et al.*, 2009). Mit Hilfe weiterer Untersuchungen wurden in *Populus* ebenfalls drei Gene (*MADS27-29*) gefunden, die eine große Ähnlichkeit zu den *DAM*-Genen aus *Euphorvia esula* aufweisen (Horvath *et al.*, 2009). Eine weitere wichtige Erkenntnis aus diesen

Untersuchungen ist, dass die Expression der DAM-Gene bevorzugt in Meristemen und Knospen durch Kälteinduktion erfolgt (Horvath *et al.*, 2009).

In *Prunus persica* (L.) Batsch (Pfirsich) konnten ebenfalls Gene identifiziert werden, die ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen wie die DAM-Gene (Bielenberg *et al.*, 2008). Sechs dieser Gene konnten als Kandidatengene in Zusammenhang mit der Ausbildung von Abschlussknospen gebracht werden.

### 1.3.5 Verbindung zwischen Blütengenen und weiteren Entwicklungsprozessen

Die genetische Regulierung der Blütenentwicklung sowie der Dormanz- und Seneszenzsteuerung in Pflanzen ist sehr komplex und erst zum Teil geklärt (Hoenicka *et al.*, 2008). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Überexpression einiger Blüten-Gene Auswirkungen auf eine ganze Reihe anderer Abläufe in der (morphologischen) Entwicklung einer Pflanze zur Folge haben kann (Bewley *et al.* 2000).

*FUL* und dazu homologe Gene wie z. B. 35S::*BpMADS4* aus Birke konnten bereits erfolgreich zur Induktion einer frühen Blüte in mehreren Pflanzenspezies eingesetzt werden (Nishikawa *et al.*, 2010; Flachowsky *et al.*, 2007). Eine Überexpression dieser Gene in Pappel führte jedoch nicht zu diesem Erfolg. Allerdings wurde in diesen Pflanzen eine gestörte Winterdormanz und Seneszenz beobachtet (Hönicka *et al.*, 2008; siehe Abbildung 5).

Auch eine Überexpression des Gens *FLOWERING PROMOTING FACTOR 1 (FPF1)* aus *Arabidopsis* führt in Pappel, im Gegensatz zu *Arabidopsis* (Kania *et al.* 1997; Melzer *et al.* 1999), nicht zu der erwünschten frühen Blüte (Hoenicka *et al.*, 2012), hat aber ebenfalls Auswirkungen auf einige andere Entwicklungsprozesse. Diese transgenen Pflanzen weisen veränderte phenotypische Merkmale bzgl. ihres Größenwachstums und ihrer Holzeigenschaften auf. Zudem unterscheiden sich diese transgenen Pflanzen auch in Hinsicht auf ihre mechanischen und chemischen Eigenschaften von ihren natürlichen Klonen.

Eine Überexpression des Blüten-Meristem-Identitätsgens *LFY* führt zwar zu einer frühzeitigen Blüte, jedoch werden nur einzelne Blüten gebildet (Weigel und Nilsson 1995). Weitere unerwünschte Folgen dieser Überexpression sind Kleinwuchs und eine gestörte Ausbildung von Pollen. Zudem wechselten einige der weiblich-transgenen Pappelklone nach einer Überexpression von *LFY* ihr Geschlecht. Sie

entwickelten statt der weiblichen Geschlechtsorgane männliche Blüten inklusive eines ausgeformten Staubblattes (Weigel und Nilsson, 1995; Nilsson und Weigel, 1997).

Im Gegensatz zu den oben genannten Genen führt eine Hitze-induzierte Überexpression von *FT* und den *Populus*-homologen Genen *PtFT1* und *PtFT2* nach heutigen Erkenntnissen ohne erkennliche Nebenwirkungen zu der erwünschten frühen Blüte (Zhang *et al.*, 2010).

Anhand der oben aufgeführten Beispiele wird deutlich, wie komplex die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Regulationsmechanismen zur Steuerung der Blütenentwicklung und weiterer Entwicklungsprozesse im pflanzlichen Organismus sind.



**Abbildung 6: a** 35S::*BpMADS4* *Populus tremula* L. Klone (T1 und T2) und nicht-transgene Kontrollpflanzen. **b** die nicht-transgenen Kontrollpflanzen verlieren unter Winterbedingungen ihre Blätter und bilden vegetative Knospen aus. **c** die 35S::*BpMADS4* Pappeln (T1) legen keine vegetativen Knospen an und behalten auch unter winterlichen Umweltbedingungen ihre Blätter (Hoenicka *et al.*, 2008).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien in den Reinheitsgraden „Molecular biology grade“, „for molecular biology“ oder „zur Analyse“ (p.a) wurden, soweit nicht anders aufgeführt, bezogen von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Sigma Aldrich (München), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe).

#### 2.1.2 Größenstandards

Für die Größenabschätzung der cDNA-Fragmente bei der Agarose-Gelelektrophorese wurde der *Smart Ladder* (Eurogentec, Köln) laut Herstellerangaben gemeinsam mit den zu analysierenden Proben elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Qualitätskontrolle der Ribonukleinsäure (RNA) mit dem Bioanalyzer wurde der Agilent RNA 6000 Nano Ladder (Agilent, USA; Abbildung 7) nach Angaben des Herstellers verwendet.

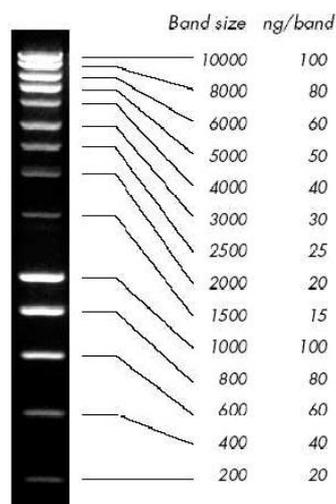


Abbildung 7: DNA-Größenstandard Smart Ladder (Eurogentec, Köln).

### 2.1.3 Kits

Die folgenden molekularbiologischen Kits wurden bei der Erstellung dieser Arbeit eingesetzt und laut Herstellerangaben verwendet:

#### Zur Herstellung von cDNA:

DyNAmo™ cDNA Synthesis Kit for qRT-PCR (Finnzymes, Finnland)

#### Für die Degradationskontrolle der RNA am Bioanalyzer:

Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA)

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Im Folgenden nicht aufgeführte Puffer und Lösungen sind im Text angegeben.

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden verwendet:

#### RNA-Extraktion:

##### Extraktionspuffer

2 % CTAB Hexadecyltrimethylammoniumbromid		10 g
2 % PVP (Polyvinylpyrrolidinone K 30)		10 g
100 mM TRIS-HCl, pH 8,0	1M	50 ml
25 mM EDTA	0,5 M	25 ml
2 M NaCl	5 M	200 ml
<u>0,5 g/l Spermidin</u>	<u>0,925 g/ml</u>	<u>270 µl</u>

RNase-freies Wasser, mischen und sterilisieren

2 % β-Mercaptoethanol (vor Gebrauch des Extraktionspuffers zuzufügen)

**SSTE:**

1 M NaCl	5 M	10 ml
0,5 % SDS	10 %	2,5 ml
10 mM TRIS-HCl, pH 8,0	1M	500 $\mu$ l
<u>1 mM EDTA</u>	<u>0,5 M</u>	<u>100 <math>\mu</math>l</u>

RNase-freies Wasser, mischen und sterilisieren

Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)

**TE:**

10 mM TRIS-HCl, pH 7,5	1M	500 $\mu$ l
<u>0,1 mM EDTA</u>	<u>0,5 M</u>	<u>10 <math>\mu</math>l</u>

RNase-freies Wasser

**PCR-Reaktionen:**

Desoxynucleotid-Mix

5 mM dATP

5mM dCTP

5 mM dGTP

5 mM dTTP

BD-Puffer

0,8 M TRIS-HCl

0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

25 mM Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )

Dimethylsulfoxid (DMSO)

### Agarose-Gelelektrophorese:

50 x TAE:

242 g	TRIS
57,1 ml	Eisessig
100 ml	EDTA 0,5 M

#### **2.1.5 Enzyme**

Die für die PCR-Reaktion verwendete DCSPol-DNA Polymerase (*Thermus spec.*) wurde bezogen von der Firma DNA Cloning Service eK (Klein Flottbek).

#### **2.1.6 Pflanzenmaterial**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgendem Pappel-Wildtyp und transgenen Pappeln gearbeitet:

- dem männlichen *Populus tremula* L-Klon W52 (ursprüngliche Herkunft aus Tapiau, Russland)
- den transgenen Linien T 35-1, T 35-8, T 35-10 und T 37-10. Diese Linien sind durch die genetische Transformation des *Populus tremula* L.-Klons W 52 mit dem Genkonstrukt 35S::*BpMADS4* entstanden (Hoenicka *et al.*, 2008).

Die ausgepflanzten Bäume bzw. deren Klone, sowie die *in vitro*-Kulturen befanden sich auf dem Anwesen des Instituts für Forstgenetik in Großhansdorf.

#### **2.1.7 Primer**

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Für die Lagerung wurden Lösungen mit einer Konzentration von 100 pmol/μl in RNase und DNase freiem HPLC-Wasser angesetzt. Für die PCR-Reaktionen wurden Aliquots mit einer Konzentration von 10 μM hergestellt. Gelagert wurden die Primer bei -20 °C.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Ernte des Pflanzenmaterials

Mit Hilfe einer Zwillie wurden Zweige eines erwachsenen Pappelbaume-Klons geerntet. Abhängig von der Jahreszeit wurden, innerhalb eines Zeitraums von 2-4 Wochen, Blätter (wenn vorhanden), sowie Blatt- und Blütenknospen geerntet.

Die Beerntung des *in vitro*-Materials der transgenen Linien erfolgte jeweils einmal und unter einer Sterilwerkbank mit Messer und Pinzette. Hier wurde ausschließlich Blattmaterial verwendet. Dazu wurden 100-150 mg Gewebe in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung des Materials erfolgte bis zur Weiterverarbeitung in einem Gefrierschrank bei -80°C

### 2.2.2 Analyse von RNA

#### 2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Knospen- sowie Blattmaterial erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode von Chang *et al.* (1993).

Mit Hilfe einer Schwingmühle von Retch (Deutschland) und zwei in das Reaktionsgefäß überführten Stahlkugeln wurde das Pflanzenmaterial fein gemahlen (Frequenz: 21 Hz; 2 x 2 Min.). Zu den so vorbereiteten Proben wurde 1 ml des 65 °C warmen und mit 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzten Extraktionspuffer hinzu pipettiert und gründlich vermischt. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach einer weiteren gründlichen Homogenisierung wurde 2 Minuten bei 16.500 x *g* zentrifugiert. Der sich während der Zentrifugation gebildete Überstand wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Ansatz wurde mit 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt und durch invertieren gemischt. Zur Trennung der Phasen wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur und 16.500 x *g* zentrifugiert.

Die obere wässrige Phase, welche sich während der Zentrifugation gebildet hatte und die RNA beinhaltete, wurde in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde anschließend einmal wiederholt, wobei der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Nach der Zugabe von 1/3 Vol. Lithiumchlorid wurde die Probe erneut durch invertieren gemischt und die RNA über Nacht bei 4 °C gefällt.

Zur Pelletierung wurde am folgenden Tag 20 Minuten bei 4 °C und 18.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 200 µl SSTE gelöst. Bei schlechter Löslichkeit der Pellets wurde an dieser Stelle 2-5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Um weitere verbliebene Proteine abzutrennen, wurde erneut mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert (s. o.). Ab diesem Zeitpunkt sollte beachtet werden, dass die Proben stets eisgekühlt gelagert wurden.

Die obere RNA-beinhaltende Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Unter Zugabe von 2 Vol. abs. Ethanol und einer finalen Konzentration von 100 µg/ml Glykogen (peqLab, Erlangen) wurde die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt.

Durch 20 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 18.000 x *g* wurde die RNA präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde zur Pelletierung der RNA 10 Minuten bei 4 °C und 18.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die RNA unter einer Sterilwerkbank bei 37 °C getrocknet und schließlich in 20-25 µl TE-Puffer (pH 7,5) gelöst.

Gelagert wurden die RNA-Proben bei -80 °C.

### 2.2.2.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch mittels *NanoDrop ND - 1000* (Thermo Scientific, USA) bestimmt. Bei der Messung durch den *NanoDrop* handelt es sich um eine kontinuierliche Messung gegen TE-Puffer als Blindwert. Hierzu wurden 2 µl der unverdünnten zu messenden RNA-Probe auf die Messvorrichtung pipetiert. Gemessen wurden hierbei die Absorptionen bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm, 230 nm und 340 nm. Die für die Wellenlängen von 260 bzw. 280 nm ermittelten Werte der optischen Dichte wurden neben der Konzentrationsbestimmung auch zur Reinheitsberechnung verwendet. Der erste und gleichzeitig wichtigste Wert für die Reinheitsbestimmung bildet die Ratio  $A_{260/280}$ . Der optimale Wert liegt hier bei 2. Als Zweites wird für die Reinheit die Ratio 260/230 ( $A_{260/230}$ ) herangezogen. Dieser sollte optimaler Weise in einem Bereich zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Werte unter 1,6 weisen auf eine Verschmutzung der Probe hin. Durch eine Messung bei 340 nm erfolgte eine Hintergrundkorrektur, diese wird bei den

Absorptionen bei 260 nm und 280 nm subtrahiert. Für die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wird eine modifizierte Form des Lambert'schen Gesetzes genutzt, bei dem ein Korrekturfaktor (e) in die Berechnungen einbezogen wird. Bei der Messung von RNA liegt dieser bei 40.

$$c = (A * e) / b$$

$$\text{mit: } A = E * b * c$$

A: Absorption [AU]

e: Korrekturfaktor [ng cm/μl]

b: Wellenlänge [cm]

E: Extinktion [ $L * mol^{-1} * cm^{-1}$ ]

c: Konzentration des Moleküls [ng/μl]

### 2.2.2.3 Degradationskontrolle der RNA am Bioanalyzer

Zur Degradationskontrolle der isolierten RNA-Proben wurde eine Vermessung am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA) durchgeführt.

Die Methodik, die dem Bioanalyzer zu Grunde liegt, ist eine elektrophoretische Auftrennung auf mikrofabrizierten Chips und eine Detektion durch Laser-induzierte Fluoreszenz-Strahlung.

Die Ausgabe der Messungen erfolgt anhand eines Elektropherogramms und eines Elektrophorese-ähnlichen Bildes, welches die Ergebnisse wie Probenkonzentration und die sog. Ribosomale-Ratio abbildet.

Im Rahmen dieser Arbeit stand allerdings die sog. RNA-Integrity-Number (RIN) im Vordergrund. Hierbei handelt es sich um eine von Agilent Technologies eingeführte standardisierte Zahl bzw. einen Software-Algorithmus, um die RNA-Integration zu interpretieren und individuelle Probeneigenschaften zu beseitigen.

Mit Hilfe der RIN ist eine Proben-Klassifizierung von 1-10 möglich. Dabei steht die 1 für das am stärksten degradierte Profil und die 10 für das intakteste Profil (Schröder *et al.*, 2006). Für die Messung wurde i. d. R. je eine Probe pro Erntedatum und Linie verwendet. Bei einem schlechten Ergebnis, d. h. einer RNA-Integrity-Number (RIN) unter 5 wurde die Messung mit einer weiteren Probe des Datums und der Linie wiederholt.

Die Beladung des Chips, sowie die eigentliche Messung erfolgten nach Herstellerprotokoll.

## 2.2.2.4 RT-PCR

### 2.2.2.4.1 cDNA-Synthese

Um Ausgangsmaterial für die PCR zu erhalten, wurde die extrahierte RNA mittels Reverser Transkription (RT) in cDNA (complementary DNA) übersetzt.

Jeweils 800 ng RNA wurde für die Reverse Transkription eingesetzt.

Für die cDNA-Synthese wurde der folgende Standard-Ansatz verwendet:

10 µl RT Puffer (2 x)  
1 µl Oligo (dt) (100 ng/µl)  
800 ng Template RNA  
2 µl M-MuLV Rnase H + RT  
x µl RNase-freies Wasser

Der Ansatz wurde in einer PCR-Maschine (Mx 3000P™ von Stratagene) nach dem folgenden Ansatz inkubiert.

Inkubationsprogramm für die RT-PCR:

25 °C	10 min	Primer Anlagerung
37 °C	30 min	cDNA Synthese
85 °C	5 min	Reaktionsstop
4 °C	∞	Kühlung der Proben

### 2.2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die Amplifikation (Vervielfältigung) spezifischer DNA-Moleküle. Dabei ist es möglich, jeden gewünschten DNA-Abschnitt mit bekannten Sequenzen zu amplifizieren. Benötigt werden hierfür Oligonukleotide, die komplementäre Sequenzen zu dem Ende des ausgewählten Abschnitts besitzen und mit ihnen hybridisieren können. Gewöhnlich wird bei der DNA-Polymerase auf die Taq-Polymerase zurückgegriffen. Diese entstammt ursprünglich aus dem thermophilen Mikroorganismus *Thermus aquaticus* und wird heutzutage rekombinant

hergestellt. Eine wichtige Eigenschaft dieses Enzyms ist seine Stabilität bei höheren Temperaturen, dadurch wird sie bei der für die DNA-Denaturierung erforderlichen hohen Temperatur nicht inaktiviert.

Die eingesetzten Primer wurden am Randbereich von Exons entworfen, um die Amplifikation genomischer DNA (gDNA) auszuschliessen. Die Expression der *Populus*-homologen Gene zu *FT* (*PtFT1*: *POPTR\_0008s07730* und *PtFT2*: *POPTR\_0010s18680*), *CONSTANS* (*PtCO2*: *POPTR\_0004s10800*) sowie zweier *DAM*-homologer Gene (*POPTR\_0007s03260* und *POPTR\_0007s03260*) wurde untersucht.

Die synthetisierte cDNA (2.2.2.4) wurde für die RT-PCR-Reaktionen eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einer PCR-Maschine (*Primus 96 plus* Thermal Cycler von MWG AG Biotech) durchgeführt.

Zur Kontaminationskontrolle wurde bei jeder PCR eine Wasserkontrolle und eine DNA-Kontrolle verwendet. Die Wasserkontrolle enthielt dabei statt cDNA-Template HPLC-Wasser.

Jeweils 1 µl des 1:4 verdünnten cDNA-Ansatzes wurde im folgenden PCR-Ansatz eingesetzt:

2,5 µl	PCR Puffer BD (DNA Cloning Service, Klein Flottbek)
1,8 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (DNA Cloning Service, Klein Flottbek)
1,0 µl	dNTP's (5 mM) (DNA Cloning Service, Klein Flottbek)
1,0 µl	Forward (5')-Primer (10 mM)
1,0 µl	Reverse (3')-Primer (10 mM)
0,12µl	Taq-Polymerase (5 U/µl) (DNA Cloning Service, Klein Flottbek)
0,5 µl	DMSO
16,08µl	Wasser

Der so vorbereitete PCR-Ansatz wurde nach folgendem Programm amplifiziert:

1.	94°C	2 min	} x Zyklen
2.	94°C	1 min	
3.	T <sub>A</sub>	2 min	
4.	72°C	2 min	
5.	72°C	5 min	
6.	8°C	∞	

Die Annealing-Temperaturen (T<sub>A</sub>) der PCR-Reaktionen wurden den jeweils eingesetzten Primerpaaren angeglichen.

### 2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die cDNA-Proben wurden durch horizontale Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden 1,3 %-ige Agarose (AppliChem, Darmstadt) / TAE-Gele verwendet, welche mit 2,5 µl/100 ml RotiSafe (Roth, Karlsruhe) versetzt wurden. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1/10 Vol. Ladepuffer Orange G (30 % Agarose (w/v), 1 % Orange G (w/V) versetzt. Als Größenstandard wurde neben den Proben, 5 µl des *SmartLadder* (Eurogentec, Köln) aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 90-130 Volt.

Die mit Hilfe des RotiSafe angefärbten Gele wurden mittels Gel Imager (INTAS<sup>T</sup>) unter UV-Licht optisch sichtbar gemacht und fotografiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression von Blüten- und Dormanz-Genen

Die auf die Transkriptionsaktivität von Blüten- und Dormanzgenen wirkenden Faktoren und deren Wechselwirkungen sind bei mehrjährigen Pflanzen, wie z. B. Bäumen, weitgehend unbekannt. Hoenicka *et al.* (2008) konnten jedoch bei transgenen Pappeln, welche das *FRUITFULL*-homologe Gen *BpMADS4* überexprimierten eine Abhängigkeit zwischen der Überexpression dieses Blüten-Meristem-Identitätsgens und der Winterdormanz nachweisen. Die Überexpression dieses Gens in den Pappelklonen W52 und Brauna 11 führte, abweichend zu den Beobachtungen von Elo *et al.* (2007) und Flachowsky *et al.* (2007) in Apfel und Birke, nicht zu einer frühen Blüte. Allerdings wurde eine gestörte Winterdormanz und Seneszenz beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien ein Zusammenhang der Expression dieses Blüten-Meristem-Identitätsgens zur Dormanz und Seneszenz plausibel. Diese vorliegenden Ergebnisse bzw. Beobachtungen bilden den Ausgangspunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

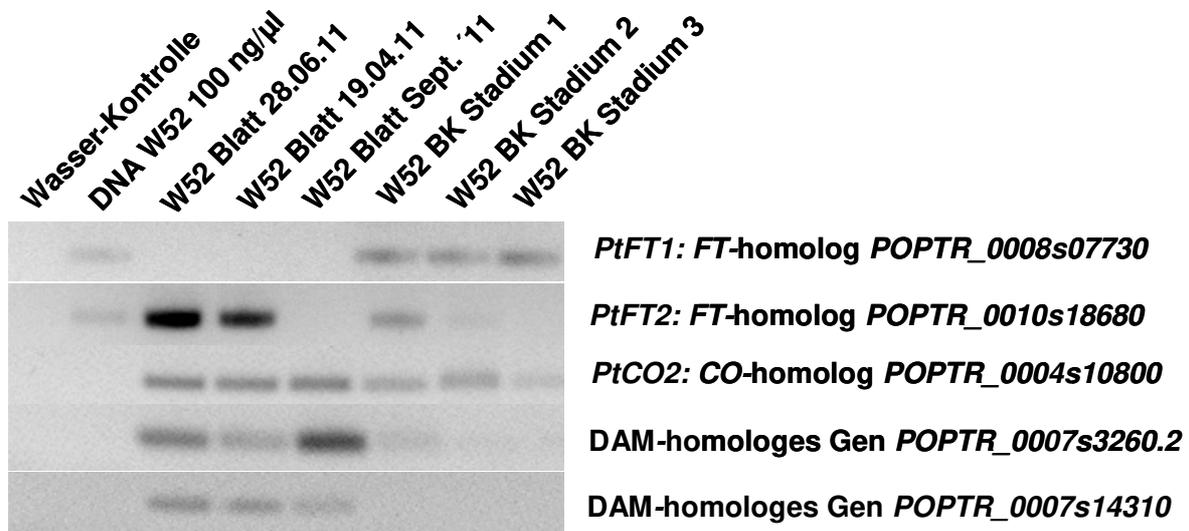
Für den quantitativen Nachweis der Genexpression einiger Blüten- und Dormanzgene wurden Blätter sowie Blattknospen (vegetative Knospen) von *BpMADS4*-exprimierender Linien, sowie zum Vergleich Blatt- und Blütenknospen des Wildtyps W52 geerntet. Die Beerntung erfolgte in einem Zeitraum von Oktober bis Januar 2012 und in Abständen von einem Monat bis zu zwei Wochen. Nach Extraktion (vgl. 2.2.2.1), photometrischer Konzentrationsbestimmung (vgl. 2.2.2.2), Degradationskontrolle (vgl. 2.2.2.3) und Übersetzung in cDNA (vgl. 2.2.2.4) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, vgl. 2.2.2.4.2) zur Amplifikation der jeweiligen (s. u.) Gene durchgeführt. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.2.5).

### 3.2 Ergebnisse der vorbereitenden Untersuchungen

Die Auswahl der Proben für die cDNA-Synthese und Expressionsanalyse basierte auf den Ergebnissen der photometrischen Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen (vgl. 2.2.2.2). Dabei wurden die Proben anhand der für RNA spezifischen optimalen Konzentrations- und Reinheitswerte ausgewählt. Die gewünschte Konzentration der RNA sollte dabei mindestens einen Wert von 200 ng/µl aufweisen. Für die Auswahl bzgl. der Reinheit wurden, wie bereits oben erwähnt (vgl. 2.2.2.2), die ausgegebenen Ratio-Werte  $A_{260/280}$  und  $A_{260/230}$  herangezogen. Die Ergebnisse des ersten Ratio-Wertes ( $A_{260/280}$ ) liegen mit einem Maximum von 2,25 (Probe 7; vgl. Tabelle 2) bei den meisten Proben leicht über dem optimalen Wert. Da es sich bei den ermittelten Reinheitswerten der ausgewählten Proben allerdings ausschließlich um Werte unterhalb von 2,3 handelt, können diese ohne Einschränkungen für die folgenden Schritte verwendet werden. Die Ergebnisse des zweiten Ratio-Wertes ( $A_{260/230}$ ) befinden sich teilweise unter dem zu erwartenden Optimum. Der niedrigste Wert findet sich mit 1,75 bei Probe 26 (vgl. Tabelle 2). Da sich die meisten gemessenen Ratio-Werte der ausgesuchten Proben jedoch nahe dem Optimum von 2 - 2,2 befinden, konnten die in Tabelle 2 aufgelisteten Proben für die folgenden Untersuchungen verwendet werden. Anschließend erfolgte die Degradationskontrolle dieser Proben am *Agilent 2100 Bioanalyzer* (vgl. 2.2.2.3). Das Ziel dieser Messung war die Bestimmung der *RNA-Integration-Number* (RIN), wobei die Proben einen möglichst hohen RIN-Wert (von 10-6) aufweisen sollen. Der Großteil der Proben entsprach den gewünschten Anforderungen bzgl. des RIN-Bereichs von 10-6. In drei Einzelfällen musste allerdings aufgrund des spärlich vorhandenen Ausgangsmaterials auf Proben zurückgegriffen werden, deren RIN-Werte mit 5 bzw. 5,6 (Proben 26-28) eigentlich außerhalb des gewünschten Bereichs lagen.

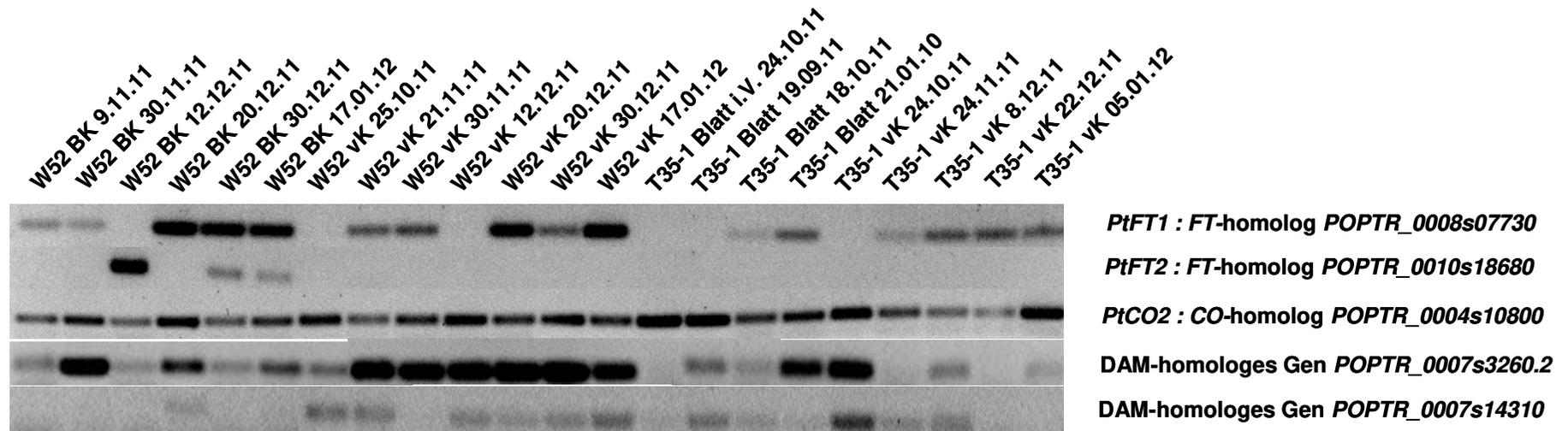
Die Tabelle 2 im Anhang bildet die Ergebnisse der oben genannten Messungen ab.

### 3.3 Ergebnisse der Expressionsanalysen



**Abbildung 8:** RT-PCR zur Untersuchung der saisonalen Expressionen von *PtFT1*, *PtFT2*, *PtCO2*, *POPTR\_0007s3260.2* und *POPTR\_0007s14310* in Blatt- und Blütengewebe des Wildtyps (W52; Teil I).

Jeweils 800 ng RNA aus den Blättern und Blüten (unterschiedliche Streckungs- bzw. Entwicklungsstadien der Blüten sind mit `1-3` gekennzeichnet) des Wildtyps von verschiedenen Erntezeitpunkten wurden durch reverse Transkription mit Oligo-d(T)-Primern in cDNA überführt. Die so gewonnenen cDNA's wurden 1:4 verdünnt und für PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern eingesetzt. Das hier verwendete Material des Wildtyps fungierte als Positivkontrolle bzw. Ausgangspunkt für den Vergleich einer gestörten Expression der untersuchten Gene in den transgenen *BpMADS4*-exprimierenden Pflanzen (T35-1, T35-5, T37-10, T35-8).



**Abbildung 9:** RT-PCR zur Untersuchung der saisonalen Expressionen von *PtFT1*, *PtFT2*, *PtCO2*, *POPTR\_0007s3260.2* und *POPTR\_0007s14310* in Blütenknospen (BK), vegetativen Knospen (vK), Blatt und *in vitro*-Material (i.V.) des Wildtyps (W52) und der transgenen Linie T35-1 (Teil II).

Jeweils 800 ng RNA aus den Blütenknospen, vegetativen Knospen des Wildtyps (W52), sowie *in vitro*-, Blatt-Material und vegetative Knospen der transgenen Linie T35-1 von verschiedenen Erntezeitpunkten wurden durch reverse Transkription mit Oligo-d(T)-Primern in cDNA überführt. Die so gewonnene cDNA wurden 1:4 verdünnt und für PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern verwendet.



**Abbildung 10: RT-PCR zur Untersuchung der saisonalen Expression von *PtFT1*, *PtFT2*, *PtCO2*, *POPTR\_0007s3260.2* und *POPTR\_0007.14310* in Blatt- und *in vitro*-Material (I.V.), sowie vegetativen Knospen (vK) der transgenen Linien T35-5, T37-10 und T35-8 (Teil III).**

Jeweils 800 ng RNA aus den Blättern, vegetativen Knospen von *in vitro*-Kulturen der transgenen Linien T35-5, T37-10 und T35-8 von verschiedenen Erntezeitpunkten wurden durch reverse Transkription mit Oligo-d(T)-Primern in cDNA überführt. Die so gewonnenen cDNA's wurden 1:4 verdünnt und für PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern verwendet.

### 3.3 Ergebnisse der Expression der untersuchten Blüten- und Dormanzgene

#### 3.3.1 Expression des Blütengens *PtFT1*

*In vitro*-Material wurde ausschließlich von den transgenen Pflanzen gewonnen. Die Blattproben der *in vitro*-Kulturen T35-1 und T35-5 zeigten keine Expression des Gens *PtFT1* (Abbildung 9 und 10). Im Gegensatz dazu wurde bei der Linie T37-10 eine Expression dieses Gens nachgewiesen.

Anhand der in Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen des Gens *PtFT1* wird deutlich, dass in den Blattproben des Wildtyps von April bis September keine Expression des Gens *PtFT1* vorliegt. In den Blättern aller transgenen 35S::*BpMADS4*-Linien konnte eine *PtFT1*-Expression festgestellt werden (Abbildung 9 und 10). Bei der transgenen Linie T35-1 steigt die Expression von *PtFT1* von September bis Januar (18.10.11 bis 21.01.10) an. Die Expression in den Blättern der Linie T35-5 fällt vom ersten Erntedatum im September (19.09.11) zum letzten Erntedatum im Oktober (18.10.11) ab. In der September-Blatt-Probe des im Gewächshaus wachsenden Baumes der Linie T37-10 zeigt sich eine starke Expression. Mit Ausnahme der Probe vom 24.10.11 (keine Expression) ist eine Abnahme im Expressionsmuster von *PtFT1* von September bis Januar nachzuweisen. In der Blattprobe der Linie T35-8 vom 01.12.11 zeigt sich keine Expression, in der Probe vom 14.12.11 ist hingegen eine leichte Expression vorhanden.

Die Blütenknospen des Wildtyps exprimieren *PtFT1* bereits am ersten Erntedatum im November (Abbildung 9). Diese Expression setzt sich in einem relativ gleich bleibenden Muster bis zum letzten Erntedatum im Januar fort. Die Ergebnisse über die Expression des Blütengens *PtFT1* konnten ausschließlich in den Blüten und Blütenknospen des Wildtyps untersucht werden, da sich bei den transgenen Linien zu diesem Zeitpunkt noch keine entwickelten.

In den Wildtyp-Blüten (Streckungsstadium 1-3) ist zu allen Zeitpunkten eine gleich bleibende Expression des hier untersuchten Gens vorhanden (Abbildung 8).

In der ersten Probe der vegetativen Knospen vom 25.10.11 des Wildtyps W52 ist keine Expression von *PtFT1* vorhanden (Abbildung 9). Am 21.11.11 und 30.11.11 zeigt sich eine mittelstarke Expression des hier untersuchten Gens. In der Probe vom

12.12.11 ist keine Expression erkennbar. Mit Ausnahme der Probe vom 30.12.11 wurde bei den zwei folgenden Proben des Monats Dezember und Januar (20.12.11 und 17.01.12) eine starke Expression nachgewiesen.

Auch bei T35-1 findet eine Steigerung in der Expressionsstärke von *PtFT1* in den vegetativen Knospen statt (Abbildung 9). Der Anstieg beginnt hier ab dem ersten Erntedatum im Oktober (24.10.11) und setzt sich bis zum letzten Erntedatum im Januar (05.01.11) fort.

In den vegetativen Knospen der transgenen Linie T35-5, die erstmals am 24.10.11 geerntet wurden, zeigt sich bis zum Erntedatum am 22.12.11 ebenfalls eine Zunahme der Expression. Am letzten Erntedatum (05.01.12) der vegetativen Knospen von T35-5 geht die Expression leicht zurück (siehe Abbildung 8). In den vegetativen Knospen der Linie T37-10 steigt die Expression, ebenso wie in der Linie T35-1, vom 24.11.11 bis zum 22.12.11 deutlich an und fällt zum letzten Erntedatum am 05.01.12 ab. In der Probe vom 05.01.12 findet in diesem Fall keine Expression des Gens *PtFT1* statt (siehe Abbildung 8).

Die zur Kontrolle aufgetragene DNA-Probe zeigt eine leichte Bande (Abbildung 8).

Zusammenfassend betrachtet konnte einzig in der *in vitro*-Probe der Linie T37-10 eine Expression des Gens *PtFT1* nachgewiesen werden. In den Blattproben des Wildtyps fand von April bis September keine Expression des hier untersuchten Gens statt. Im Gegensatz dazu konnte in den Blattproben der transgenen Linien aus den Herbst-/Wintermonaten eine Expression von *PtFT1* nachgewiesen werden. Allerdings zeigt sich bei den Linien T35-5 und T37-10 ein ansteigendes Expressionsmuster und bei der Linie T35-1 ein abfallendes. Die zwei Blattproben der Linie T35-8 deuten ebenfalls auf steigendes Expressionsmuster hin. In den Blüten und Blütenknospen des Wildtyps wird das *PtFT1*-Gen vom ersten bis zum letzten Erntedatum annähernd gleichbleibend exprimiert. In den von T35-1, T35-5 und T37-10, sowie des Wildtyps geernteten vegetativen Knospen steigt die Expression des Gens *PtFT1* an. In den transgenen Linien nimmt die Expression zum letzten Erntedatum im Januar ab. Bei dem Wildtyp ist die Expression von *PtFT1* unverändert stark.

### 3.3.2 Expression des Blütengens *PtFT2*

Eine Aktivität von *PtFT2* konnte ausschließlich im Wildtyp-Material festgestellt werden (Abbildung 8-10). In dem untersuchten *in vitro*-Material konnte keine Expression des Blütengens *PtFT2* festgestellt werden. In den Blattproben des Wildtyps nimmt die Expression vom 19.04.11 zum 28.06.11 deutlich zu. Im September ist in der Blattprobe keine Expression des *PtFT2*-Gens vorhanden. In den restlichen drei aufgetragenen Proben, wobei es sich um die drei Blüten-Proben handelt, zeigt sich eine Abnahme in der Expression vom Stadium 1 bis zum Stadium 3 (bzgl. Streckung; Abbildung 8). Auf den Abbildungen 9 und 10 sind einzig bei drei Proben Expressionen nachzuweisen. Die erste deutet auf eine starke Expression in einer Blütenknospe des Wildtyps W52 vom 12.12.11 hin. Die anderen Banden zeigen sich ebenfalls bei Blütenknospen des Wildtyps. Hierbei handelt es sich um eine mittelstarke Expression von *PtFT2* am 30.12.12 und 17.01.12. Ein eindeutiges Expressionsmuster ist hier nicht ersichtlich. Zudem zeigt sich wie auch bei dem Gen *PtFT1* bei der DNA-Kontrolle eine leichte Bande.

### 3.3.3 Expression des CO-homologen Gens *PtCO2*

Für das Gen *PtCO2* ist in allen Proben, mit Ausnahme der DNA-Probe in Abbildung 8, eine Expression nachzuweisen (Abbildung 8-10). Ein Muster in Abhängigkeit zum jeweiligen Erntedatum ist nicht erkennbar.

### 3.3.4 Expression des DAM-homologen Gens *POPTR\_0007s03260.2*

Bei den *in vitro*-Blättern der transgenen Linie T35-1 und T37-10 ist keine Expression des hier untersuchten DAM-homologen Gens erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei T35-5 (*in vitro*) eine leichte Expression dieses Gens (Abbildung 9). Das DAM-homologe Gen *POPTR\_0007s03260.2* wird zwischen April und September in den Blättern des Wildtyps exprimiert (Abbildung 8). Die aus dem Gewächshaus geernteten Blattproben vom 19.09.11 bis zum 21.01.10 der Linien T35-1, T35-5 und T37-10 (mit einem Ausfall am 24.10.11) zeigen einen stetigen Anstieg in der Expression von *POPTR\_0007s03260.2* (Abbildung 9 und 10). In den Blattproben der Linie T35-5 mit Standort im Gewächshaus zeigt sich eine Zunahme in der Stärke der

Banden vom 19.09.11 zum 24.10.11, was eine Erhöhung in der Expressionsstärke von *POPTR\_0007s3260.2* bedeutet. In den untersuchten Blatt-Proben der Linie T35-8 konnte eine Aktivität dieses Gens ebenfalls bestätigt werden.

In allen Blütenknospen-Proben des Pappelwildtyps wurde eine Aktivität des DAM-homologen Gens festgestellt (Abbildung 9). Allerdings gab es Expressionsschwankungen. Die deutlich stärkste Expression lag in der Probe vom 30.11.11 vor. Daraufhin wechseln sich mittelstarke und schwache Expressionen ab. Eine relativ schwache Genexpression zeigte sich bei den Blüten-Proben der Streckungs-Stadien 1 und 2 (Abbildung 8).

In den vegetativen Knospen des Wildtyps zeichnet sich ein sehr stark abweichendes Ergebnis in Bezug auf das vorher genannte Expressionsmuster der Blütenknospen ab (Abbildung 9). Am 25.10.11 lag eine mittelstarke Expression vor. In den darauf folgenden Proben (vom 21.11.11 bis 17.01.12) wurde die Expression des DAM-homologen Gens stärker. Innerhalb der vegetativen Knospen der Linie T35-1 wird das DAM-homologe Gen im Oktober sehr stark exprimiert. Zum letzten Erntedatum am 05.01.12 fällt die Expression jedoch (mit einigen Ausfällen) deutlich ab (vgl. Abbildung 9). Im Gegensatz dazu steigt die Expression in den vegetativen Knospen der Linie T35-5 zum letzten Erntedatum an. In der ersten Probe vom 24.10.11 ist keine Expression erkenntlich. Allerdings wird das Gen ab der folgenden Probe vom 24.11.11, hier liegt eine leichte Expression vor, bis zum 05.01.12 mit leichten Schwankungen stetig stärker exprimiert (Abbildung 10). In den Proben der vegetativen Knospen von T37-10 ist kein eindeutiges Muster zu erkennen. Zu sehen ist eine leichte Expression am 24.11.11, sehr leichte Expressionen am 08.12.11 und 22.12.11 und eine mittelstarke Expression am 05.01.12 (Abbildung 10). Bei den vegetativen Knospen der Linie T35-8 konnte keine Expression von *POPTR\_0007s3260.2* nachgewiesen werden (Abbildung 10).

Zusammenfassend wird bzgl. der transgenen Linien deutlich, dass in den *in vitro*-Kulturen keine bis minimale Expression des hier untersuchten DAM-homologen Gens stattfand. In den Blattproben des Wildtyps konnte von April bis September eine Expression von *POPTR\_0007s3260.2* festgestellt werden. Die Blattproben der transgenen Linien zeigen von Herbst zum Winter ein zunehmendes Expressionsmuster, welches im Winter teilweise abfällt. In den Blüten und Blütenknospen konnte eine durchgängige Expression des DAM-homologen Gens nachgewiesen werden. In den vegetativen Knospen des Wildtyps wurde das hier

untersuchte Gen mit Abstand am stärksten und zudem sehr konstant exprimiert. Bei den Proben der transgenen-vegetativen Knospen sind bei den untersuchten Linien keine einheitlichen Expressionsmuster bzgl. des hier untersuchten DAM-homologen Gens erkennbar.

### **3.3.5 Expression des DAM-homologen Gens *POPTR\_0007s14310***

Die Expression des DAM-homologen Gens *POPTR\_0007s14310* war bei dem Großteil der Proben sehr schwach (Abbildung 8-10). Allerdings ist die Expression in den vegetativen Knospen und in den Blättern des Wildtyps stärker und konstanter als bei den anderen Proben ausgeprägt.

Eine leichte Genexpression konnte bei den Blättern des *in vitro*-Materials von T35-1, T35-5 und T37-10 festgestellt werden (Abbildung 9-10).

In den Blattproben des Wildtyps war die Expression des DAM-homologen Gens sehr schwach (vgl. Abbildung 8). Die untersuchten Blattproben der transgenen Linie T35-1 zeigten eine Abnahme der Expression vom 19.09.11 zum 21.10.10. Am letzten Erntedatum (21.01.12) war keine Genexpression in den Blättern von T35-1 festzustellen. In der ersten Blattprobe der Linie T35-5 gibt eine sehr schwach ausgeprägte Bande Auskunft über eine leichte Expression des DAM-Gens am 19.09.11. Am folgenden Erntedatum, dem 18.10.11, ist anhand der Abbildung eine weitere Reduzierung der Expression nachzuweisen. In den aus dem Gewächshaus geernteten Blättern von T37-10 wird das untersuchte DAM-homologe Gen *POPTR\_0007s14310*, mit Ausnahme des letzten Erntedatums, sehr leicht exprimiert. Am letzten Erntedatum am 21.01.10 findet keine Expression des Gens statt. Innerhalb der Blätter der Linie T35-8 ist keine Expression nachweisbar.

In den Blüten des Wildtyps wird das DAM-Gen *POPTR\_0007s14310* in keinem der drei Streckungsstadien exprimiert.

Bei den untersuchten Blütenknospen des Wildtyps ist einzig eine sehr leichte Expression in der Probe vom 20.12.11 zu sehen.

In den Blüten des Wildtyps wird das DAM-Gen *POPTR\_0007s14310* in keinem der drei Streckungsstadien exprimiert.

Im Gegensatz dazu wiesen alle geernteten vegetativen Knospen des Wildtyps, mit Ausnahme der Probe vom 30.11.12, eine leichte Expression des untersuchten Gens auf (siehe Abbildung 9). Somit lag in allen Proben des Wildtyps, mit Ausnahme der

Blüten und Blütenknospen-Proben, eine kontinuierlich-leichte Expression des Gens *POPTR\_0007s14310* vor.

In den vegetativen Knospen der transgenen Linie T35-1 wurde das DAM-homologe Gen am 24.10.11 relativ stark exprimiert. Diese fiel zum nächsten Erntedatum am 24.11.11 ab, stieg am darauf folgenden Datum (08.12.11) erneut wenig an. Die beiden letzten Proben wiesen keine Expression des hier untersuchten Gens (*POPTR\_0007s14310*) auf. Insgesamt handelt es sich um einen abfallenden Verlauf (siehe Abbildung 9). Die Banden der vegetativen Knospen von T35-5 geben Aufschluss darüber, dass der Verlauf der Expression über den Erntezeitraum, vom 24.10.11 zum 05.01.12, annähernd gleich bleibend ist (siehe Abbildung 9). In den vegetativen Knospen der Linie T37-10 wird das DAM-Gen *POPTR\_0007s14310* in einem relativ gleichmäßig abfallenden Muster exprimiert (siehe Abbildung 9). Wie bereits in dem Blatt der transgenen Linie T35-8 findet auch in der untersuchten vegetativen Knospe keine Expression von *POPTR\_0007s14310* statt.

Eine abschließende zusammenfassende Betrachtung über die Expression des DAM-homologen Gens *POPTR\_0007s14310* zeigt, dass dieses Gen in den Blattproben aller Linien zu jedem Erntedatum (mit Ausnahme der Linie T35-8) exprimiert wird. Am deutlichsten ist allerdings die Expression in den vegetativen Knospen. In den *in vitro*-Kulturen der transgenen Linien wird das Gen minimal bis gar nicht exprimiert. Ebenso in den Blüten und Blütenknospen des Wildtyps.

## 4. Diskussion

### 4.1 Expression der Blütengene

Wie bereits unter Punkt 1.3.2 erwähnt, werden den Genen *PtFT1* und *PtFT2* unterschiedliche Aufgaben zugeteilt. Das Gen *PtFT1* wurde von Böhlenius *et al.* (2006) als homologes Gen zu dem bekannten Gen *FT* identifiziert. Eine Überexpression dieses Gens in Pappeln führte bereits nach vier Wochen zu einer Ausbildung blütenähnlicher-Strukturen (Böhlenius *et al.*, 2006). Diese Experimente lieferten Hinweise darauf, dass es sich bei dem Gen *PtFT1* um einen starken Induzierer einer Blüte handelt.

Untersuchungen von Hsu *et al.* (2006) und Yamaguchi *et al.* (2005) identifizierten ein weiteres zu *Arabidopsis thaliana* homologes *FT*-Gen. Dieses wurde als *PtFT2* bezeichnet. Daraufhin durchgeführte Experimente von Hsu *et al.* (2011) lieferten Hinweise auf geteilte Aufgaben und Unterschiede in dem saisonalen Expressionsmuster von *PtFT1* und *PtFT2* (vgl. 1.3.2). Das bedeutet, dass nicht, wie ursprünglich von Böhlenius *et al.* (2006) angenommen, einzig die Expression von *PtFT1* für den Beginn der reproduktiven Phase, das Ausbleiben eines Wachstums in unfavorisierten Jahreszeiten und die Knospenbildung verantwortlich ist.

Transkripte von *PtFT1* sind nach Hsu *et al.* (2011) ausschließlich während der Wintermonate im Überfluss vorhanden, während die Expression von *PtFT2* ausschließlich in den Frühlings- und Sommermonaten stattfindet. Eine niedrige Expression von *PtFT1* in undifferenzierten Meristemen zeigt den Beginn der reproduktiven Phase an, während die Expression von *PtFT2* als Signal für das vegetative Wachstum während der Wachstumsphase dient. *PtFT2* nimmt zudem eine Rolle als Multistress-Sensor in einem komplexen molekularen Netzwerk ein (vgl. 1.3.2 und Abbildung 4).

#### 4.1.1 Expression von *PtFT1*

In den *in vitro*-Proben des transgenen Blattmaterials findet keine bzw. eine leichte Expression des Gens *PtFT1* statt. Die Abwesenheit einer Expression in dem Blattmaterial der *in vitro*-Proben könnte evtl. auf die vorherrschenden künstlichen Bedingungen des Standortes (bzgl. Temperatur- und Lichtverhältnisse) u. o. die Juvenilität der Pflanzen zurück geführt werden. Die leichte Expression des Gens

*PtFT1* in dem geernteten Blattmaterial der *in vitro*-Kultur von T37-10 könnte auf den Insertionsort der T-DNA bzw. auf Variabilität zurückgeführt werden. Aufgrund der genetischen Transformation mit dem 35S::*BpMADS4*-Genkonstrukt hätte man eine Expression des *PtFT1*-Gens auch bei nicht induzierenden Umweltbedingungen erwartet.

Die unter 3.1.1 festgestellte nicht vorhandene Expression des Gens *PtFT1* in den Blattproben des Wildtyps von April bis September unterstützt die von Hsu *et al.* (2011) beschriebene Beobachtung, dass in Blättern von Frühling bis zum Ende des Herbsts keine Expression des Gens *PtFT1* stattfindet. In dem aus dem Gewächshaus geernteten Blattmaterial der transgenen Linie T35-1 zeigt sich, mit dem Anstieg der Expression zum Januar, ebenfalls das nach Hsu *et al.* (2011) zu erwartende Ergebnis. Das zeigt, dass das Genkonstrukt *BpMADS4* die Expression von *PtFT1* nicht entscheidend beeinflusst hat. In dem Blatt-Material der Linie T35-5 wird das Gen am ersten Erntedatum (19.09.11) nicht exprimiert am zweiten (18.10.11) nur leicht. Hier liegt somit vermutlich ein ansteigender Verlauf vor, dies entspricht nicht den nach Hsu *et al.* (2011) zu erwartenden Ergebnissen. Eine Expression sollte in den Blättern erst ab Dezember erfolgen. Andererseits sollte berücksichtigt werden, dass beide Studien an verschiedenen Standorten stattgefunden haben. Hsu's Untersuchungen wurden an einem südlicheren Standort durchgeführt als die Studien in dieser Arbeit. Aufgrund des geringen Probenmaterials kann eine potentielle Störung in der Expression nur vermutet werden. In den Blättern der transgenen Linie T37-10 liegt ebenfalls ein von den Ergebnissen nach Hsu *et al.* (2011) abweichendes Phänomen vor, da die Expression von *PtFT1* im Herbst relativ stark war und im Januar abfällt. Die Gründe hierfür könnten, wie bereits oben erwähnt, evtl. ebenfalls auf eine Variabilität oder den Insertionsort der T-DNA zurückgeführt werden. Die Ergebnisse der Blattproben von T35-8 aus Dezember weisen daraufhin, dass eine Einordnung in das Schema des Expressionsmusters von Hsu *et al.* (2011) möglich wäre. Allerdings ist aufgrund der geringen Probenanzahl der Linie T35-8 eine vollständige Auswertung der Ergebnisse in diesem Fall nicht möglich.

Die Expression des Gens *PtFT1* in den Blütenknospen des Wildtyps steigt ab den im November geernteten Proben an und erreicht ab Ende Dezember das erwartete Maximum. Auch dieses ist, übereinstimmend nach den Ergebnissen von Hsu *et al.* (2011), zu erwarten. Der Ausfall in der Probe vom 12.12.11 ist möglicherweise auf

Fehler während der PCR-Reaktion oder eine Störung in der Expression zurückzuführen (vgl. 4.1.2 Expression von *PtFT2*). In den drei untersuchten Proben aus unterschiedlichen Streckungsstadien der Blüte des Wildtyps konnte eine leichte Expression des Gens beobachtet werden. Vergleichende Untersuchungen zur Expression dieses Gens in den Blüten der Pappel wurden bisher noch nicht durchgeführt. Da die Ernte der Blüten von Zweigen aus den Wintermonaten stammten, könnte die Expression von *PtFT1* auf den Erntezeitpunkt zurückgeführt werden.

In den von Oktober bis Januar geernteten vegetativen Knospen des Wildtyps steigt die Expression ab den im November geernteten Proben an und erreicht im Januar das erwartete Maximum der Expression. Auch dieses ist, übereinstimmend nach den Ergebnissen von Hsu *et al.* (2011), zu erwarten. Die drei Ausfälle, die in den Proben vom 12.12.11 und 25.10.11 zu sehen sind, sind möglicherweise ebenfalls auf Fehler während der PCR-Reaktion zurückzuführen. Da in den weiteren Expressionsanalysen dieser Proben positive Ergebnisse erzielt werden konnten, können Fehler während der DNA-Extraktion und cDNA-Synthese ausgeschlossen werden. In den vegetativen Knospen der transgenen Linie T35-1 zeigt sich im Expressionsmuster von *PtFT1* nur eine leichte Abweichung von den nach Hsu *et al.* (2011) zu erwartenden Ergebnissen. Diese findet sich in den letzten aus Januar geernteten Proben. Hier ist die Expression des Gens deutlich niedriger als die im Wildtyp. Diese Beobachtung kann allerdings auch darauf zurückgeführt werden, dass sich diese Pflanzen, abgesehen von der Überexpression des Gens *BpMADS4* und der daraus resultierenden potentiellen Störung der Genexpression, in ihrer Entwicklung noch nicht in der Phase der Etablierung reproduktiver Strukturen befanden. Die Abnahme in der Stärke der Expression in den vegetativen Knospen der Linie T35-5 vom 22.12.11 zum 05.01.12 zeigt an, dass der Verlauf von dem eines optimalen Verlaufs nach Hsu *et al.* (2011) leicht abweicht. Mit einer maximalen Expression in der Probe aus Dezember liegt diese etwas zu früh vor. In den vegetativen Knospen von T37-10 deutet sich ein ähnliches Expressionsmuster an. Die Gründe für diese abweichenden Verläufe liegen evtl. darin, dass sich die Pflanzen (s. o.) in einem relativ frühen Stadium ihrer Entwicklung befanden oder dass sich die Pflanzen an einem anderen Standort als die von Hsu herangezogenen Pflanzen befanden.

In der Kontrolle des Wildtyps (DNA W52; Abbildung 8) zeigt sich eine leichte Expression des Gens *PtFT1*. Da aufgrund der Position der Primer über eine Intron-Exon-Grenze eine Detektion von DNA aufgrund von vorherig positionierten Introns nicht möglich ist, kann vermutet werden, dass es sich hier entweder um einen PCR-Fehler oder ein Pseudogen handelt. Pseudogene sind funktionslose Duplikate von funktionierenden Genen. Es wird angenommen, dass eine Art von Pseudogenen als microRNA's (miRNA's) funktionieren und regulatorische Aufgaben besitzen. Somit spielen sie für die Transkription und Expression echter Gene eine wichtige Rolle (Knippers, 2006). Falls an dieser Stelle allerdings Pseudogene vorhanden wären, hätte man bei allen Proben eine Bande erhalten sollen. In diesem Fall trifft dies nicht zu (Abbildung 8-10). Daher wird eher vermutet, dass PCR-Fehler eine Rolle gespielt haben. Um Probleme mit Pseudogenen zu vermeiden, wird empfohlen, die RNA für die RT-PCR mit DNase zu behandeln, um somit genomische DNA-Reste zu eliminieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf verzichtet.

Zusammenfassend betrachtet wird deutlich, dass die Expression des Gens *PtFT1*, mit Ausnahme der transgenen Linie T37-10, dem nach Hsu *et al.* (2011) zu erwartendem Verlauf sehr nahe kommt. Die teilweise abgeschwächten oder verzögerten Expressionsmuster der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp weisen nicht zwangsläufig auf eine gestörte Transkription des hier untersuchten Gens hin. Die Gründe für die Abweichung können, wie bereits oben erwähnt, auch auf die aktuelle Entwicklungsstufe oder die vorherrschenden Bedingungen am Standort der Pflanzen zurückgeführt werden. Die relativ starken Abweichungen des nach Hsu *et al.* (2011) zu erwartenden „idealen“ Expressionsmuster von *PtFT1* in der *in vitro*-Kultur der transgenen Linie T37-10 deutet in dieser Pflanze darauf hin, dass sich die Pflanzen in einer juvenilen Phase befinden oder der Insertionsort der T-DNA Auswirkungen auf die Expression von *PtFT1* hat. In wie weit diese Störung im Expressionsmuster die weitere Entwicklung der transgenen Pflanze beeinträchtigt, kann derzeit nicht abgeschätzt werden.

#### **4.1.2 Expression von *PtFT2***

Das Gen *PtFT2* wird ausschließlich während der Frühlings- und Sommermonate sowie bei Stress exprimiert (vgl. Punkt 4.1). Aus diesem Grund entspricht die Expression in den Blättern des Wildtyps aus April und Juni dem nach Hsu *et al.*

(2011) zu erwartenden Ergebnis. In den Blüten(knospen) des Streckungsstadiums 1 und 2 (Abbildung 8) fand ebenfalls eine Expression von *PtFT2* statt. Da Hsu *et al.* (2011) in den Blüten während des Blühzeitraums ebenfalls eine Expression nachweisen konnte, entspricht auch dieses Ergebnis den Erwartungen. Die nicht vorhandene Expression des hier untersuchten Gens in der Blüte des Streckungsstadiums 3 weist evtl. daraufhin, dass die Expression des Blütengens *PtFT2* während der Entwicklung der Blüten abnimmt. Die unter 3.3.2 festgestellte Expression in den Blütenknospen des Wildtyps aus den Wintermonaten weicht von den optimalen Ergebnissen bzgl. des jahreszeitlichen Expressionsmusters von *PtFT2* nach Hsu *et al.* (2011) deutlich ab. Allenfalls wäre hier eine leichte Expression im Herbst zu erwarten. Wie bereits unter 4.1 erwähnt, nimmt das Gen *PtFT2* neben der Steuerung des vegetativen Wachstums eine Rolle als Multistress-Sensor ein. Aus diesem Grund könnte die Expression des hier untersuchten Gens auf eine Stresssituation in den Blütenknospen der geernteten Zweige hinweisen. Ein anderer Grund für die Expression von *PtFT2* könnte die bis zur Ernte erfolgte Lagerung der Zweige in Räumen mit warmen Temperaturen sein. Da in diesen Blütenknospen die Expression des im Winter sehr aktiven Gens *PtFT1* teilweise sehr ausgeprägt war, scheint dies allerdings weniger wahrscheinlich.

Die nicht vorhandenen Expressionen von *PtFT2* in den transgenen vegetativen Knospen und Blättern zeigen an, dass durch die Überexprimierung von *BpMADS4* die Regulierung von *PtFT2* in diesem Gewebe in den Herbst- und Wintermonaten nicht beeinträchtigt wird. Da allerdings keine Blätter und Blütenknospen aus den Frühlings- und Herbstmonaten vorlagen, kann durch eine Positiv-Kontrolle keine potentiell doch vorhandene Störung nachgewiesen werden.

Im DNA-Material des Wildtyps zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Untersuchung des Gens *PtFT1*. Auch hier lässt sich auf den ersten Blick auf eine leichte Expression von *PtFT2* schließen. Da es sich bei dem Gen *PtFT2* um ein homologes Gen zu *FT* handelt, welches im Laufe der Evolution dupliziert wurde, handelt es sich hierbei vermutlich ebenfalls um einen PCR-Fehler (vgl. 4.1.1; Abbildung 9).

Somit entsprechen die gewonnenen Ergebnisse allesamt den zu erwartenden. Wie auch bei dem Gen *PtFT1* scheint die Überexprimierung von *BpMADS4* keine entscheidene Änderung in der Expression von *PtFT2* ausgelöst zu haben. Für eine Sicherung der hier gewonnenen Erkenntnisse sollten zusätzliche Proben (besonders

von dem transgenen Material) aus den Sommer- und Frühlingsmonaten auf die Expression von *PtFT2* untersucht werden.

#### 4.1.3 Expression von Gens *PtCO2*

Wie bereits unter Kapitel 3.3.3 erwähnt, konnte in jedem Probenmaterial eine Expression des Gens *PtCO2* nachgewiesen werden (Abbildung 8-10). Das Gen *CO* aus *Arabidopsis* ist in ein komplexes und zum Teil noch ungeklärtes molekulares Netzwerk eingeflochten. Fest steht allerdings, dass es eine zentrale Rolle für die Regulierung der Tageslänge der Blüte spielt (Böhlenius *et al.*, 2006). Kontrolliert wird es, indem die mRNA ca. 12 Stunden nach Tagesanbruch exprimiert wird. Hierauf kann das sich ergebene Expressionsmuster zurück geführt werden. Gezeigt werden kann hiermit allerdings auch, dass in diesem Fall die Überexprimierung von *BpMADS4* ebenfalls keinen entscheidenden Einfluss auf die Expression dieses Gens ausübt.

#### 4.2 DAM-Gene und ihre Expression

*DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX (DAM)* Gene weisen einen hohen Verwandtschaftsgrad zu den Genen *AGAMOUS-LIKE 24* und *SHORT VEGETATIVE PHASE* aus *A. thaliana* auf. Ihre Regulation steht in engem Zusammenhang mit der Steuerung, der Einleitung und der Entlassung aus der Endodormanz. Die Funktion von DAM-Genen konnte erstmals durch Versuche an Pfirsich eingeordnet werden (Bielenberg *et al.*, 2008). Diese Untersuchungen zeigten, dass die identifizierten DAM-Gene je nach Jahreszeit ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen. So konnte während der kürzer werdenden Photoperioden (Herbst) ein zunehmendes Expressionsmuster nachgewiesen werden. Im Winter ist eine Expression der DAM-Gene minimal bis nicht vorhanden. Weitere Untersuchungen zur Dormanz, bei denen DAM-Gene aus dem Genom eines Pfirsichbaums entfernt wurden, resultierten in einem Verlust der Fähigkeit zur Endodormanz-Induzierung. Des Weiteren wurden Hinweise auf eine gewebespezifische Transkription der DAM-Gene gefunden.

Experimente, die an der mehrjährigen Modellpflanze *Euphorbia esula* (Brachwurz) durchgeführt wurden, führten zur Charakterisierung weiterer DAM-Gene. Diese werden vorzugsweise in Meristemen und Knospen durch Kälte-Induktion exprimiert.

Die bisherigen Untersuchungen zur Expression von DAM-Genen in der Gattung *Populus* zeigen, dass die Gene in dieser Gattung bevorzugt in Abhängigkeit zu Kurztags-Bedingungen exprimiert werden (Ruttink *et al.*, 2007). Dabei ist allerdings nicht auszuschließen, dass auch unter anderen Bedingungen, z. B. Temperaturen ähnlich denen des Sommers, eine Expression einiger DAM-Gene möglich ist (Li *et al.*, 2009). Zudem wird angenommen, dass die DAM-Gene Kontrolle über die Dormanz ausüben, indem sie *FT* oder zu diesem Gen homologe Gene (z. B. *PtFT1* und *PtFT2*) unterdrücken (Horvath *et al.*, 2010).

Die genaue Regulation, Expression und physiologische Wirkung der DAM-Gene in der Gattung *Populus* konnte bisher nicht aufgedeckt werden. Sie scheinen allerdings ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Induzierung und der Entlassung aus der Endodormanz zu spielen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung des Expressionsmusters von DAM-Genen in einer Art der Gattung *Populus* im Vergleich zu transgenen *BpMADS4* exprimierenden Pappeln, stellt den ersten Versuch dieser Art dar.

#### **4.2.1 Expression von *POPTR\_0007s03260.2***

Die nicht vorhandene Expression des untersuchten DAM-homologen Gens in der *in vitro*-Linie T35-1 entspricht den Erwartungen von Li *et al.* (2009). Die Untersuchungen des Wildtyps haben zwar gezeigt, dass das Gen *POPTR\_0007s03260.2* auch bei den in der Klimakammer vorherrschenden Bedingungen exprimiert werden könnte, allerdings schließen die Ergebnisse von Li *et al.* (2009) ebenfalls ein, dass eine Expression nicht zwangsläufig stattfinden muss. Die in der *in vitro*-Kultur der Linie T35-5 festgestellte leichte Expression des DAM-homologen Gens *POPTR\_0007s3260.2* zeigt an, dass dieses Gen leicht exprimiert wird. Wenn es sich, wie bereits oben erwähnt, um ein Gen ähnlich denen aus Brachwurz handelt, würde hier keine Störung vorliegen, weil diese DAM-Gene auch während der wärmeren Monate exprimiert werden. In der *in vitro*-Pflanze der Linie T37-10 weist die Abwesenheit jeglicher Expression des DAM-homologen Gens auf das nach Li *et al.* (2009) erwartete Ergebnis (minimale bis nicht vorhandene Expression) hin.

Das sich ergebene Expressionsmuster in den Blättern des Wildtyps (vgl. 3.3.4) zeigt an, dass das hier untersuchte DAM-homologe Gen während der wärmeren Monate

exprimiert wird. Diese Feststellungen bestätigen die Beobachtungen von Li *et al.* (2009), dass eine Exprimierung von DAM-Genen in Blättern stattfindet und nicht zwangsläufig mit der Phase der Dormanz assoziiert sein muß. Der deutliche Anstieg in der Expression im September weist zudem daraufhin, dass, wie nach den Ergebnissen von Li *et al.* (2009) zu erwarten, eine Zunahme in der Expression bei kürzeren Tagen erfolgt. In den Blättern der transgenen Pflanze T35-1 aus dem Gewächshaus ist die beobachtete Steigerung in der Expression des DAM-Gens ebenfalls zu erwarten, da eine Zunahme in der Expression der DAM-Gene eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung der Dormanz spielt. Auch in den Blättern von T35-5 ist eine leichte Steigerung in der Expression von *POPTR\_0007s3260.2* erkennbar, welches auf die Erkenntnisse von Li *et al.* (2009) hinweist. Da lediglich Blattmaterial von zwei Erntezeitpunkten (vgl. Abbildung 10) untersucht werden konnte, kann in diesem Fall allerdings kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. In den Blättern von T37-10 deutet der Anstieg der Expression von *POPTR\_0007s3260.2* ebenfalls auf das zu erwartende Muster hin. Die Expression in den Blättern der Linie T35-8 zeigt an, dass das untersuchte Gen im Winter aktiv ist. Da das zum Ende geerntete Blatt-Material der transgenen Linien allerdings aus den Monat Dezember u. o. Januar stammt, wird deutlich, dass hier trotzdem eine potentielle Störung vorliegt. Im Normalfall sollte hier statt eines Blattes eine vegetative Knospe vorhanden sein.

In den Blütenknospen des Wildtyps findet eine stetige Expression des DAM-homologen Gens statt. Dies deutet auf das zu erwartende Ergebnis einer gewebespezifischen Expression nach Li *et al.* (2009) und Jiménez *et al.* (2009) hin. Die minimalen Expressionen in den Blüten des Wildtyps deuten daraufhin, dass das hier untersuchte DAM-homologe Gen während der Blüte abwesend bis minimal vorhanden ist. Diese Beobachtung deckt sich mit denen von Jiménez *et al.* (2009) bei Pfirsich.

In den aus dem Winter geernteten Blattknospen (vegetative Knospen) des Wildtyps zeigt sich, dass das hier untersuchte DAM-homologe Gen auch in diesem Gewebe und zu dieser Jahreszeit sehr aktiv ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von Horvath *et al.* (2009), der feststellte, dass das Gen *DAM1* aus Brachwurz auch während des Winters exprimiert wird. Entgegen den zu erwartenden Ergebnissen, welche mittels der Untersuchungen am Material des Wildtyps gewonnen werden konnten, folgt die Expression des hier untersuchten DAM-

homologen Gens in den vegetativen Knospen der transgenen Linie T35-1 keinem einheitlichem Muster. Dennoch zeigt der angedeutete Abfall in der Stärke der Expression, dass hier eine potentielle Störung vorliegt. Für eine Störung spricht auch das Vorhandensein von Blättern im Monat Januar. An dieser Stelle sollte allerdings beachtet werden, dass die vorherrschenden Bedingungen im Gewächshaus nicht mit denen außerhalb des Gewächshauses (im Freien) gleichgesetzt werden können. In den vegetativen Knospen der transgenen Linie T35-5 ist die Expression des untersuchten DAM-homologen Gens ebenfalls deutlich niedriger als die in den vegetativen Knospen des Wildtyps. Zudem steigt sie zum letzten Erntedatum Anfang Januar leicht an. Diese Beobachtung entspricht, wie auch die der dazu gehörigen *in vitro*-Kultur, nicht dem nach Li *et al.* (2009) zu erwartendem Ergebnis. An dieser Stelle hätte sich ein abfallendes Expressionsmuster von Herbst bis Winter zu abzeichnen sollen. Da in den vegetativen Knospen dieser Linie die Transkription des DAM-homologen Gens allerdings über den ganzen Winter aufrechterhalten wird, kann vermutet werden, dass die Störung in der Linie T35-5 nicht so ausgeprägt ist wie die in der Linie T35-1. In den vegetativen Knospen der transgenen Pflanze T37-10 zeigt sich ein deutlich abweichendes Ergebnis von dem zu erwartenden. Da in den Wintermonaten in einigen Knospen keine bzw. nur eine sehr leichte Expression des DAM-homologen Gens stattfand, liegt hier eine potentielle Störung in der Expression von *POPTR\_0007s3260.2* vor. In der vegetativen Knospe von T35-8, welche erstmals Anfang Januar geerntet werden konnte, deutet die Abwesenheit einer Expression des DAM-homologen Gens ebenfalls auf eine Störung im Expressionsmuster des hier untersuchten DAM-homologen Gens hin. Für eine abschließende Beurteilung über eine potentielle Störung der Expression in dieser Linie ist allerdings zu wenig Material vorhanden.

Ausgehend von den Untersuchungen und Ergebnissen von Li *et al.* (2009) an *Prunus persica* und Jiménez *et al.* (2009) an Brachwurz konnte durch die hier durchgeführten Experimente gezeigt werden, dass sich die Expressionsmuster des hier untersuchten DAM-homologen Gens abschnittsweise mit beiden Beobachtungen decken. Anhand des Wildtyps-Materials konnte die gewebespezifische Expression ebenso wie die Aktivitätssteigerung unter Kurztag-Bedingungen gezeigt werden. Außerdem konnte durch die nachgewiesene Expression des hier untersuchten DAM-homologen Gens während der Frühlings- und Sommer-Monate bewiesen werden, dass dieses Gen nicht unbedingt mit der Phase der Dormanz assoziiert sein muss.

Somit kann abschließend zusammengefasst werden, dass die Expression des Gens *POPTR\_0007s3260.2* in den transgenen Linien, im Vergleich zu der des Wildtyps, durch die Überexpression von *BpMADS4* nur teilweise gestört ist. Am eindeutigsten manifestiert sich dies z. B. daran, dass das DAM-homologe Gen nur teilweise in den transgenen *in vitro*-Pflanzen dieser Linien exprimiert wird und in den aus Winter geernteten vegetativen Knospen unterschiedliche Expressionsmuster nachzuweisen sind. Der unterschiedliche Verlauf der Expressionsmuster von denen des Wildtyps weist jedoch nicht zwangsläufig auf eine Störung hin. Der Grund hierfür könnte auch darin liegen, dass diese Pflanzen nicht im Freien stehen und sich zudem nicht in einer etablierten reproduktiven Phase befinden. Ein weiterer Grund für eine potentielle Störung könnte die Überexprimierung von *BpMADS4* oder der Insertionsort der zugehörigen T-DNA sein.

#### **4.2.2 Expression von *POPTR\_0007s14310***

Die Abwesenheit der Expression des hier untersuchten DAM-homologen Gens in der *in vitro*-Pflanze der Linie T35-1 könnte darauf hindeuten, dass die Expression dieses Gens unter sommer- bzw. frühlings-ähnlichen Bedingungen minimal bis nicht vorhanden ist. Die beobachtete sehr leichte Expression in der *in vitro*-Kultur der Linie T35-5 deutet ebenfalls auf die von Horvath *et al.* (2009) festgestellte Beobachtung hin (siehe oben). Die *in vitro*-Pflanze der Linie T37-10 exprimiert das DAM-Gen in einem geringen Maße, ebenso wie die *in vitro*-Pflanze der Linie T35-5. Dies könnte ein weiteres Mal bestätigen, dass auch dieses DAM-homologe Gen nicht ausschließlich während der Dormanz exprimiert wird.

Die unter Punkt 3.3.5 festgestellte leichte Expression in den Blättern des Wildtyps, welche zum September hin abfällt zeigt an, dass dieses Gen, wie bereits durch die Ergebnisse der *in vitro*-Kulturen vermutet, während der wärmeren Jahreszeiten exprimiert wird. Dies entspricht, wie auch bei dem DAM-homologen Gen *POPTR\_0007s3260.2*, ebenfalls den Beobachtungen von Horvath *et al.* (2009), der feststellte, dass eine DAM-Gen Expressierung nicht *per se* mit der Phase der Dormanz assoziiert sein muß. Wie unter 3.3.5 bereits erwähnt fällt die Expression von *POPTR\_0007s14310* in den Blättern der transgenen Pflanze T35-1 ab. In der Linie T35-5 deutet sich anhand der geernteten Blätter ebenfalls ein abfallendes Expressionsmuster an (vgl. 3.3.5). In den aus dem Gewächshaus geernteten Blättern

von T37-10 wird das untersuchte DAM-homologe Gen *POPTR\_0007s14310*, mit Ausnahme des letzten Erntedatums, stetig exprimiert. In den Blättern der Linie T35-8 findet keine Expression des hier untersuchten DAM-homologen Gens statt. Ein einheitliches Expressionsmuster ist bezüglich dieses DAM-homologen Gens in den Blättern der transgenen Linien nicht auszumachen. Vielmehr deutet diese Verschiedenheit in den Expressionsstärken von *POPTR\_0007s14310* daraufhin, dass hier eine potentielle Störung vorliegt.

Anhand der Ergebnisse (vgl. 3.3.5), die die Untersuchungen des Knospenmaterials (Blüten- und vegetative Knospen) des Wildtyps ergeben haben, kann gezeigt werden, dass eine gewebespezifische Expression stattfindet. Bevorzugt (wie auch bei dem DAM-homologen Gen *POPTR\_0007s3260.2*) tritt diese in den vegetativen Knospen auf. Die gewebespezifische Expression entspricht den Beobachtungen von Jiménez *et al.* (2009), nach denen eine Schwankung in der Expressionsstärke eines DAM-Gens innerhalb unterschiedlicher Gewebe möglich ist. Aufgrund des in diesem Fall vorliegenden relativ einheitlich Expressionsmusters in den vegetativen Knospen (im Vergleich zu den Blütenknospen des Wildtyps) kann angenommen werden, dass dieses Gen für die Dormanz der vegetativen Knospen verantwortlich ist. Die Abwesenheit einer Expression des DAM-homologen Gens in den Blüten weist, wie auch die des DAM-homologen Gens *POPTR\_0007s3260.2*, daraufhin, dass auch die Expression dieses DAM-homologen Gens während des Knospenausbaus minimal bis nicht vorhanden zu sein scheint.

Zusammenfassend kann anhand der hier durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass die Beobachtungen über die Aktivität des DAM-homologen Gens *POPTR\_0007s14310* außerhalb der Dormanz (nach den Ergebnissen der Blattproben des Wildtyps vom 28.06.11 und 19.04.11) ein „normaler“ Vorgang zu sein scheint. Des Weiteren scheint das in den transgenen Pflanzen beobachtete abfallende Expressionsmuster in den vegetativen Knospen -ohne die Berücksichtigung der Untersuchungen in dem Wildtyp- anzuzeigen, dass es sich hier zum einen um DAM-homologes Gen handelt, welches ebenfalls nicht zwangsläufig mit der Phase der Dormanz assoziiert sein muss und zum anderen, dass das DAM-homologe Gen bei sehr kalten Temperaturen im Winter nicht zwangsläufig nach unten reguliert wird. Außerdem scheint dieses DAM-homologe Gen eine zentrale Rolle für die Dormanz in den vegetativen Knospen zu spielen.

### 4.3 Fazit

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass in den transgenen Linien die Expressionsmuster der Blütengene *PtFT1* und *PtFT2*, sowie des Gens *PtCO2* weitgehend denen des Wildtyps entsprechen. Die leichten Abweichungen in der Expression können in diesem Fall nicht vollständig auf eine Überexpression von *BpMADS4* oder den Insertionsort der T-DNA zurückgeführt werden, da Fehler während der PCR-Reaktionen wahrscheinlicher sind. Zudem ist anzumerken, dass sich die transgenen Pflanzen in einer anderen Lebensphase (juvenile vegetative Phase) als der Wildtyp (adulte vegetative Phase) befanden.

Die Expressionsmuster der hier untersuchten DAM-homologen Gene *POPTR\_0007s3260.2* und *POPTR\_0007s14310* decken sich nicht vollständig mit denen in der Literatur beschriebenen, da die Expression der DAM-Gene nach der gängigen Ansicht während des Herbstes relativ hoch ist und zum Winter hin abnimmt. Dies ist anhand der hier gewonnenen Ergebnisse nicht ersichtlich, da die Banden fast ausschließlich sehr schwach sind, oder am Beispiel der vegetativen Knospen bzgl. *POPTR\_0007s3260.2* sehr stark erscheinen. Allerdings konnte anhand der DAM-homologen Gene gezeigt werden, dass eine gewebespezifische Expression stattfindet, die bevorzugt in den vegetativen Knospen auftritt. Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass diese Gene eine Rolle für die Dormanz in den vegetativen Knospen spielen.

## 5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Expressionsmuster ausgewählter Blüten- und Dormanzgene in Pappeln. Die aus einem Wildtyp (W52) gewonnenen Ergebnisse wurden mit denen aus transgenen *BpMADS4*-überexprimierenden Pappeln verglichen. Dabei war das Hauptaugenmerk auf die Entdeckung einer potentiellen Störung im Expressionsmuster einiger ausgewählter Gene in den transgenen Linien gerichtet. Da in diesen Pflanzen eine gestörte Seneszenz und Endodormanz beobachtet wurde, erschien eine Störung in der Expression einiger Blüten- und Dormanzgene wahrscheinlich.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass in den transgenen Linien die Expressionsmuster der Blütengene *PtFT1* und *PtFT2*, sowie des Gens *PtCO2* weitgehend denen des Wildtyps entsprechen. Die leichten Abweichungen in der Expression können in diesem Fall nicht vollständig auf eine Überexpression von *BpMADS4* oder den Insertionsort der T-DNA zurückgeführt werden, da Fehler während der PCR-Reaktionen wahrscheinlicher sind. Zudem ist anzumerken, dass sich die transgenen Pflanzen in einer anderen Lebensphase (juvenile vegetative Phase) als der Wildtyp (adulte vegetative Phase) befanden.

Die Expressionsmuster der hier untersuchten DAM-homologen Gene *POPTR\_0007s3260.2* und *POPTR\_0007s14310* decken sich nicht vollständig mit denen in der Literatur beschriebenen, da die Expression der DAM-Gene nach der gängigen Ansicht während des Herbstes relativ hoch ist und zum Winter hin abnimmt. Dies ist anhand der hier gewonnenen Ergebnisse nicht ersichtlich, weil die Banden größtenteils ziemlich schwach (von Herbst bis einschließlich Winter) erscheinen. Allerdings konnte anhand der DAM-homologen Gene gezeigt werden, dass eine gewebespezifische Expression stattfindet, die bevorzugt in den vegetativen Knospen auftritt. Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass diese Gene eine Rolle für die Dormanz in den vegetativen Knospen spielen.

## 6. Literatur

**Allosopp A (1967)** Heteroblastic development in vascular plants. *Adv. Morphol.* 6:127-171.

**Bergonzi S, Albani M (2011)** Reproductive competence from an annual and perennial perspective. *Journal of Experimental Botany Advance Access* doi: 10.1093/jxb/err192.

**Bewley J, Hempel F, McCormick S, Zambryski P (2000)** Reproductive Development. In: Buchanan *et al.* (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, Auflage: 1:1000-1006.

**Bielenberg D, Wang Y, Zhigang L, Zhebentyayeva T, Fan S, Reighard G, Scorza R, Abbott A (2008)** Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach (*Prunus persica* (L.) Batch) reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genet Genomes* 4:495-507.

**Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner A, Jansson S, Strauss S, Nilsson O (2006)** *CO/FT* Regulatory Module Controls Timing of Flowering and Seasonal Growth Cessation in Trees. *SCIENCE* 312:1040-1043.

**Bradshaw HD, Ceulemans R, Davis J, Stettler R (2000)** Emerging model systems in plant biology; Poplar (*Populus*) as model forest tree. *J Plant Growth Regul* 19:306-313.

**Corbesier L, Coupland G (2006)** The quest for florigen: a review of recent progress. *Journal of Experimental Botany* 57:3395–3403.

**Eckenwalder JE (1996)** Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler RF, Bradshaw HD, Heilmann PE, Hinckley TM (eds) *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press, Ottawa, Canada, pp 7-32.

**Elo A, Lemmetyinen J, Novak A, Keinonen K, Porali I, Hassinen M, Sopenan T (2007)** *BpMADS4* has a central role in the inflorescence initiation in silver birch (*Betula pendula*, Roth). *Physiol Plant* 131:149-158.

**Flachowsky H, Peil A, Sopenan T, Elo A, Hanke V (2007)** Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula*) in apple (*Malus x domestica*) induces early flowering. *Plant Breed* 126:137-145.

**Goebel K (1900)** *Organography of Plants Part 1. General Organography*. Oxford: Clarendon Press.

**Hoenicke H, Nowitzki O, Hanelt D, Fladung M (2008)** Heterologous overexpression of the birch *FRUITFULL*-like MADS-box gene *BpMADS4* prevents normal senescence and winter dormancy in *Populus tremula* L.. *Planta* 227:1001-1011.

- Hoenicke H, Lautner S, Klingberg A, Koch G, El-Sherif F, Lehnhardt D, Zhang Bo, Burgert I, Odermatt J (2011)** Influence of over-expression of the FLOWERING PROMOTING FACTOR 1 gene (FPF1) from Arabidopsis on wood formation in hybrid poplar (*Populus tremula* L. 3 *P. tremuloides* Michx.). *Planta* DOI: 10.1007/s00425-011-1507-8
- Horvath D, Sung S, Kim D, Chao W, Anderson J (2010)** Characterization, expression and function of DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX genes from leafy spurge. *Plant Mol Biol* 73:169-179.
- Hsu C, Adams P, Kim H, No K, Mab C, Strauss S, Drnevich J (2011)** FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *PNAS Early Edition* DOI: 10.1073/pnas.1104713108.
- Hsu C, Liu Y, Luthe D, Yuceer C (2006)** Poplar *FT2* shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* 18:1848-1861.
- Jiménez G, Reighard G, Bielenberg D (2010)** Gene expression of DAM5 and DAM6 is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. *Plant Mol Biol* 73:157-167.
- Jansson S, Douglas C (2007)** *Populus*: A Model System for Plant Biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:435-458.
- Knippers R (2006)** Molekulare Genetik. Thieme, Stuttgart, Auflage: 9.
- Ko J, Prassinis C, Keathley D, Han K, Li C (2011)** Novel aspects of transcriptional regulation in the winter survival and maintenance mechanism of poplar. *Tree Physiology* 31:208-225.
- Lang G (1987)** Dormancy: a new universal terminology. *HortScience* 22:817-820.
- Leseberg C, Li A, Kang H, Duvall M, Mao L (2006)** Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Populus trichocarpa*. *Gene* 378:84-94.
- Li Z, Reighard G, Abbott A, Bielenberg D (2009)** Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. *Journal of Experimental Botany* DOI:10.1093/jxb/erp195.
- Meilan R (1997)** Floral induction in woody angiosperms. *New Forest* 14:179-202.
- Nilsson O, Weigel D (1997)** Modulating the timing of flowering. *Curr Opin Biotechnol* 8:195-199.
- Reeves P, Coupland G (2001)** Analysis of Flowering Time Control in Arabidopsis by Comparison of Double and Triple Mutants. *Plant Physiology* 126:1085-1091.

- Rinne P, Kaikuranta P, van der Schoot C (2001)** The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant Journal* 26:249-264.
- Rhode A, Bhalerao R (2007)** Plant dormancy in perennial context. *TRENDS in Plant Science* Vol. 12 No. 5:217-223.
- Ruttink T, Arend M, Morreel K, Storme V, Rombauts S, Fromm J, Bhalerao J, Boerjan W, Rohde A (2007)** A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell* 19:2370-2390.
- Sanchez de Lorenzo Caceres J (2001)** Guía de las plantas ornamentales, Ed Ediciones Mundi-Prensa, Madrid
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006)** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* DOI: 10.1186/1471-2199-7-3.
- Srikanth A, Schmid M (2011)** Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell Mol. Life Sci.* 68:2013-2037.
- Taiz L, Zeiger E (2000)** *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Auflage: 1.
- Tuskan G, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N *et al.* (2006)** The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) *Science*. 313:1596-604
- Wang R (2007)** Flowering time control and perennialism in *Arabis alpina*, a perennial relative of *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Wareing P (1959)** Problems of juvenility and flowering in trees. *Bot. J. Linn. Soc. Lond.* 56:282-289.
- Weigel D, Nilsson O (1995)** A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377:495-500-
- Yamane H, Ooka T, Jotatsu H, Hosaka Y, Sasaki R, Tao R (2011)** Expressional regulation of PpDAM5 and PpDAM6, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperatures and dormancy-breaking reagent treatment. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, No. 10:3481-3488.

## 7. Anhang

Nr.	Linie	Material	Erntedatum	c [ng/μl]	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	RIN	Bemerkung
1	W52	Blatt	-	100,00	-	-	-	DNA-Kontrolle
2	W52	Blatt	19.04.11	413,87	-	-	-	
3	W52	Blatt	28.06.11	-	-	-	-	
4	W52	Blatt	22.09.11	892,48	-	-	-	
5	W52	BK Stadium 1	23.01.12	901,40	2,23	2,05	7,00	
6	W52	BK Stadium 2	23.01.12	1371,45	2,24	2,20	7,10	
7	W52	BK Stadium 3	23.01.12	800,70	2,25	2,04	7,10	
8	W52	BK	09.11.11	1612,16	2,20	2,02	9,10	
9	W52	BK	30.11.11	416,16	2,04	1,81	7,40	
10	W52	BK	12.12.11	1566,42	2,17	1,91	8,20	
11	W52	BK	20.12.11	663,29	2,11	1,82	7,40	
12	W52	BK	30.12.11	1232,86	2,12	1,80	7,10	
13	W52	BK	17.01.11	358,29	2,15	1,86	7,00	
14	W52	vK	25.10.11	599,02	2,19	2,11	7,50	
15	W52	vK	21.11.11	760,58	2,05	1,87	8,20	
16	W52	vK	30.11.11	685,39	2,20	1,85	8,20	
17	W52	vK	12.12.11	1830,73	2,18	1,99	7,80	
18	W52	vK	20.12.11	1093,85	2,12	1,86	7,40	
19	W52	vK	30.12.11	438,35	2,09	2,02	7,50	
20	W52	vK	17.01.12	333,24	2,16	1,83	7,10	
21	T 35-1	Blatt	24.10.11	353,33	2,11	2,16	6,70	<i>in vitro</i>
22	T 35-1	Blatt	19.09.11	919,74	2,16	2,23	8,10	
23	T 35-1	Blatt	18.10.11	662,55	2,19	1,95	6,80	
24	T 35-1	Blatt	21.01.10	438,66	2,06	1,90	8,20	
25	T 35-1	vK	24.10.11	313,88	2,14	2,22	7,80	
26	T 35-1	vK	24.11.11	415,21	2,06	1,75	5,60	
27	T 35-1	vK	08.12.11	722,00	2,19	1,88	5,60	
28	T 35-1	vK	22.12.11	1033,48	2,18	2,06	5,00	
29	T 35-1	vK	05.01.12	613,87	2,20	2,06	6,30	
30	T 35-5	Blatt	24.10.11	643,12	2,19	2,13	7,40	<i>in vitro</i>
31	T 35-5	Blatt	19.09.11	1315,86	2,17	2,21	8,10	
32	T 35-5	Blatt	18.10.11	2620,88	2,10	2,10	6,80	
33	T 35-5	vK	24.10.11	577,04	2,19	2,07	9,20	
34	T 35-5	vK	08.12.11	447,38	2,06	1,84	7,90	

Nr.	Linie	Material	Erntedatum	c [ng/μl]	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	RIN	Bemerkung
35	T 35-5	vK	22.12.11	816,76	2,24	2,08	7,10	
36	T 35-5	vK	05.01.12	685,01	2,19	2,11	6,70	
37	T 37-10	Blatt	24.10.11	390,00	2,05	1,86	6,50	
38	T 37-10	Blatt	19.09.11	1198,25	2,17	2,14	8,10	
39	T 37-10	Blatt	18.10.11	390,00	2,05	1,86	6,50	
40	T 37-10	Blatt	21.01.10	392,46	2,00	2,11	7,20	
41	T 37-10	Blatt	24.10.11	478,15	2,16	2,04	6,50	<i>in vitro</i>
42	T 37-10	vK	24.10.11	664,10	2,18	2,13	7,00	
43	T 37-10	vK	24.11.11	398,16	2,08	1,90	6,90	
44	T 37-10	vK	08.12.11	810,61	2,19	1,85	6,60	
45	T 37-10	vK	22.12.11	428,77	2,05	1,92	6,50	
46	T 37-10	vK	05.01.12	279,25	2,08	1,83	6,40	
47	T 35-8	Blatt	01.12.12	352,72	2,15	1,89	6,50	
48	T 35-8	Blatt	14.12.11	814,66	2,11	1,76	7,20	
49	T 35-8	vK	04.01.12	1130,49	2,16	2,11	6,90	

**Tabelle 2: Ergebnisse der vorbereitenden Messungen**

Aufgelistet sind die für die cDNA-Synthese und Expressionsanalyse verwendeten Proben. Die Spalte „Linie“ bezeichnet den Namen der jeweiligen Linie. Der Name der transgenen Linie besteht jeweils aus einem Buchstaben und einer sich anschließenden Nummer und ist in der zweiten Spalte aufgetragen. Das jeweilig verwendete Pflanzenmaterial ist in der folgenden Spalte aufgelistet. Dabei steht „VK“ für vegetative Knospe und BK für Blütenknospe. Des Weiteren sind in der Tabelle das Erntedatum, die Konzentrations- und Reinheitswerte, sowie die RIN-Werte aufgeführt.

**Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen benutzt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Quellen entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt worden oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen.

Datum, Unterschrift