

**Quantitativ genetische Analyse von Auxinphänotypen in Keimlingen von  
*Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Anja Raschke

geboren am 12. Januar 1982 in Halle/Saale

Gutachter:

Prof. Dr. Dierk Scheel (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland)

Prof. Dr. Ingo Heilmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland)

Prof. Dr. Thomas Lübberstedt (Iowa State University, Iowa, USA)

Datum der Verteidigung: 10. Juli 2014

Für meinen Vater

„Es ist schon so: Die Fragen sind es,  
aus denen das, was bleibt, entsteht.“

Denk an die Frage eines Kindes:  
Was tut der Wind, wenn er nicht weht?“

(Erich Kästner)

**Inhaltsverzeichnis**

**Abkürzungsverzeichnis..... III**

**Abbildungsverzeichnis..... VI**

**Tabellenverzeichnis..... VIII**

**1 Einleitung..... 1**

**1.1 Auxin..... 3**

    1.1.1 Auxinbiosynthese und -metabolismus..... 3

    1.1.2 Transport..... 5

    1.1.3 Auxinsignalkaskade..... 7

**1.2 Die Nutzung der natürlichen Variation als genetische Ressource in Pflanzen..... 9**

**1.3 Quantitative Trait Locus-Analysen..... 10**

**1.4 Zielstellung der Arbeit..... 12**

**2 Material und Methoden..... 14**

**2.1 Verwendete Materialien..... 14**

    2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial..... 14

    2.1.2 Pflanzenmaterial..... 14

    2.1.3 Medium..... 15

    2.1.4 Oligonukleotide..... 15

    2.1.5 Restriktionsenzyme..... 15

**2.2 Angewandte Methoden..... 15**

    2.2.1 Kultivierung, Phänotypisierung und Kreuzung von *A. thaliana*..... 15

        2.2.1.1 Allgemeine Kultivierung von *A. thaliana*..... 15

        2.2.1.2 Sterile Kultivierung von *A. thaliana*..... 16

        2.2.1.3 Phänotypisierung von *A. thaliana*..... 16

        2.2.1.4 Kreuzungsanalysen..... 18

        2.2.1.5 Generierung von HIFs..... 18

    2.2.2 Statistische Auswertung..... 19

        2.2.2.1 Deskriptive Statistik..... 19

        2.2.2.2 Parametrische Verfahren..... 19

        2.2.2.3 Bestimmung der Heritabilität im weiteren Sinne..... 20

    2.2.3 QTL-Kartierung..... 20

    2.2.4 Molekularbiologische Methoden..... 21

        2.2.4.1 Isolation genomischer DNA aus *A. thaliana*..... 21

        2.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... 22

        2.2.4.3 Sequenzierungsreaktion..... 22

        2.2.4.4 Restriktionsspaltung..... 22

        2.2.4.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren..... 23

**3 Ergebnisse..... 24**

**3.1 Natürliche Variation physiologischer Auxinphänotypen..... 24**

**3.2 Quantitative Vererbung der Auxinphänotypen..... 28**

<b>3.3</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung der Akzessionen Bay-0 und Sha.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung der Bay-0 x Sha RIL-Population.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>Identifizierung von auxinrelevanten QTL-Regionen.....</b>	<b>38</b>
<b>3.6</b>	<b>Funktionelle Validierung der identifizierten QTL-Regionen.....</b>	<b>45</b>
3.6.1	Funktionelle Validierung der QTL-Regionen <i>W2,4-D3</i> und <i>W2,4-D4.2</i> .....	45
3.6.2	Funktionelle Validierung der QTL-Region <i>WIAA2</i> .....	49
3.6.3	Funktionelle Validierung der QTL-Regionen <i>H2,4-D5</i> und <i>HIAA5</i> .....	50
3.6.4	Funktionelle Validierung der QTL-Regionen <i>GIR1</i> , <i>GIR2</i> und <i>GIR5</i> .....	52
<b>3.7</b>	<b>Phänotypische Charakterisierungen des <i>GIR2</i>-Locus.....</b>	<b>58</b>
3.7.1	Analysen zum <i>GIR2</i> -abhängigen Einfluss auf physiologische Auxinreaktionen.....	59
3.7.2	Analysen zum <i>GIR2</i> -abhängigen Einfluss auf physiologische GA-Reaktionen.....	61
3.7.3	Analysen zum <i>GIR2</i> -abhängigen Einfluss auf die Brassinosteroidreaktion.....	63
3.7.4	Analysen zum <i>GIR2</i> -abhängigen Einfluss auf die Saccharosereaktion.....	63
3.7.5	Analysen zum <i>GIR2</i> -abhängigen Einfluss auf weitere Temperaturphänotypen.....	64
3.7.6	Analysen zum Einfluss des Lichts auf das <i>GIR2</i> -vermittelte Hypokotylwachstum.....	66
<b>3.8</b>	<b>Identifikation eines Kandidatengens.....</b>	<b>67</b>
<b>3.9</b>	<b>Feinkartierung des <i>GIR2</i>-Locus.....</b>	<b>70</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>Natürliche genetische Variation physiologischer Auxinphänotypen.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>Feinkartierung der <i>GIR2</i>-Region.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Temperaturreaktion in Pflanzen.....</b>	<b>82</b>
4.3.1	<i>ELF3</i> - Kandidatengens des <i>GIR2.1</i> -Locus.....	83
4.3.2	Mögliche Funktionsweise von <i>ELF3</i> in der Temperaturreaktion von Bay-0 und Sha.....	83
<b>4.4</b>	<b>Phytohormonabhängige Regulation des <i>GIR2</i>-vermittelten TIIE-Phänotyps.....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>134</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>135</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>136</b>

Abkürzungsverzeichnis

♀	weiblich	DL	Dauerlicht
♂	männlich	DMSO	Dimethylsulfoxid
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
24-epi-BL	24-epi-Brassinolid	E2	ubiquitinkonjugierendes Enzym
26S	26S-Proteasom	E3	E3-Ligase
<i>A. thaliana</i>	lat. <i>Arabidopsis thaliana</i>	EC	engl. <i>Evening Complex</i>
ABC	<i>ATP BINDING CASSETTE</i>	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ABCB	Subfamilie B der ABC-Transporter	ELF3	<i>EARLY FLOWERING 3</i>
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>	ELF4	<i>EARLY FLOWERING 4</i>
ADP	Adenosindiphosphat	engl.	englisch
ATP	Adenosintriphosphat	ER	Endoplasmatisches Retikulum
AFB	<i>AUXIN SIGNALING F-BOX</i>	et al.	lat. <i>et alteri</i>
Ala	Alanin	FBP	F-BOX PROTEIN
AMI	IAM-Hydrolasen	GA	engl. <i>Gibberellic Acid</i> (Gibberellinsäure)
ANOVA	engl. <i>Analysis Of Variance</i>	GA <sub>3</sub>	Gibberellinsäure <sub>3</sub>
As	Aminosäure	GAI	<i>GIBBERELIC ACID INSENSITIVE</i>
ASK1	<i>ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOG</i>	GH3	<i>GRETCHEN HAGEN 3</i>
Asp	Aspartat	GI	<i>GIGANTEA</i>
ARF	<i>AUXIN RESPONSE FACTOR</i>	GIR	<i>GIRAFFE</i>
ATS	engl. <i>Arabidopsis Thaliana Solution</i>	Gln	Glutamin
Aux/IAA	<i>Auxin/INDOLIC ACETIC ACID</i>	Glu	Glutamat
AUX1/LAX	<i>AUXIN-RESISTANT 1/LIKE AUX 1</i>	Gly	Glycin
AuxRE	engl. <i>Auxin Responsive Element</i>	H	Hypokotyl
B	homozygot Bay-0-Allel	Het	Heterozygot
Bp	Basenpaar(e)	HIF	Heterogene Inzuchtfamilie
CAM	Camalexin	IAA	engl. <i>Indole-3-Acetic Acid</i> (Indol-3-Essigsäure)
CAPS	engl. <i>Cleaved Amplified Polymorphism Site</i>	IAAld	Indol-3-Acetaldehyd
CIM	engl. <i>Composite Interval Mapping</i>	IAM	Indol-3-Acetamid
CLK	<i>CLOCK</i>	IAN	Indol-3-Acetonitril
Chr.	Chromosom	IAOx	Indol-3-Acetaldoxim
cM	Centimorgan	IBA	engl. <i>Indole-3-Butyric Acid</i> (Indol-3-Buttersäure)
COP1	<i>CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1</i>	IG	Indolglucosinolate
CUL1	<i>CULLIN 1</i>	IGP	Indol-3-Glycerinphosphat
CYP79B2/B	Cytochrom-P450-Monooxygenase B2 bzw. B3	III1	<i>ISOPROPYL MALATE ISOMERASE SUB-UNIT 1</i>
D	Dunkelheit		

InDel	Insertion bzw. Deletion	PIL6	<i>PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE 6</i>
INRA	<i>Institute National De La Recherche Agronomique</i>	PILS	<i>PIN-LIKES</i>
IPA	engl. <i>Indole-3-Pyruvic Acid</i> (Indol-3-Brenztraubensäure)	PIN	<i>PIN-FORMED</i>
KT	Kurztag	Pro	Prolin
Leu	Leucin	p-Wert	engl. <i>Probability Value</i> (Wahrscheinlichkeitswert)
LOD	engl. <i>Log Of Likelihood Of The Odds</i> (logarithmische Wahrscheinlichkeit)	QTL	engl. <i>Quantitative Trait Locus</i>
LT	Langtag	QTN	engl. <i>Quantitative Trait Nucleotide</i>
lat.	lateinisch	RIL/RI-Linie(n)	Rekombinante Inzuchtlinie(n)
L-Trp	L-Tryptophan	RVE1	<i>REVEILLE 1</i>
LUX/PCL1	<i>LUX ARRHYTHMO/PHYTOCLOCK 1</i>	S	homozygot Sha-Allel
Mbp	Megabasenpaare	SAS	engl. <i>Shade Avoidance Syndrome</i> (Schattenvermeidung)
MDR	<i>MULTIDRUG RESISTANCE</i>	SAV3/TAA1	<i>SHADE AVOIDANCE 3/TRYPHTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1</i>
MQM	engl. <i>Multiple QTL Mapping</i> (multiple QTL-Kartierung)	SCF-Komplex	<i>SKP1-CUL-FBP-Komplex</i>
MS	Murashige-Skoog-Medium	SDS	engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
MW	Mittelwert (arithmetisches Mittel)	SF	Standardfehler
n	Stichprobenumfang	SKP1	<i>SUPPRESSOR OF KINETOCHORE PROTEIN 1</i>
n. a.	nicht analysiert	SNP	engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
n. d.	nicht detektierbar	SSLP	engl. <i>Simple Sequence Length Polymorphism</i>
NAA	engl. <i>1-Naphthaleneacetic Acid</i> (Naphthyllessigsäure)	STABW	Standardabweichung
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>	Tab.	Tabelle
NIH	<i>National Institutes Of Health</i>	TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
NIL	Nahezu Isogene Linien	TAM	Tryptamin
NIT	Nitrilasen	TAR	<i>TRYPHTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED</i>
NLS	Nukleuslokalisierungssignal	TDC	Trp-Decarboxylasen
NPA	engl. <i>1-N-Naphthylphthalamic Acid</i> (1-N-Naphthylphthalaminsäure)	Thr	Threonin
oxIAA	2-Oxoindol-3-Essigsäure	TIBA	engl. <i>2,3,5-Triiodobenzoic Acid</i> (2,3,5-Triiodobenzoessäure)
PAC	Paclobutrazol	TIHE	temperaturinduzierte Hypokotyl-elongation
PCIB	p-Chlorophenoxy-Isobuttersäure		
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)		
pH	lat. <i>potentia Hydrogenii</i>		
PHYB	<i>PHYTOCHROME B</i>		
PIF4 bzw. 5	<i>PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 bzw. 5</i>		

TIR1	<i>TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1</i>	Val	Valin
U	Ubiquitin	W	Wurzel
u.	unbekannt	w/v	engl. <i>weight/volume</i>
UGT84B1A	<i>UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 84B1A</i>	YUC	YUCCA
v/v	engl. <i>volume/volume</i>		

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: <i>De novo</i> -IAA-Biosynthese und -Metabolismus höherer Pflanzen.....	3
Abb. 1.2: Subzellulärer Auxintransport.....	6
Abb. 1.3: Auxinsignalkaskade.....	8
Abb. 1.4: Strategie zur Identifizierung und Klonierung eines QTLs.....	10
Abb. 3.1: Natürliche Variation der 2,4-D-vermittelten Inhibition des Primärwurzelwachstums verschiedener <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	24
Abb. 3.2: Geographische Herkunft von 20 resequenzierten <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	25
Abb. 3.3: Natürliche Variation physiologischer Auxinreaktionen von 20 resequenzierten <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	27
Abb. 3.4: Häufigkeitsverteilungen der physiologischen 2,4-D-Reaktion verschiedener F2-Generationen....	29
Abb. 3.5: Häufigkeitsverteilungen der physiologischen Auxinreaktionen der Sha x Bay-0 F2-Generation....	31
Abb. 3.6: Natürliche Variation physiologischer Auxinreaktionen der Akzessionen Bay-0 und Sha.....	32
Abb. 3.7: Häufigkeitsverteilung der physiologischen Auxinreaktionen in der Bay-0 x Sha RIL-Population....	36
Abb. 3.8: LOD-Plot der eindimensionalen QTL-Kartierung (CIM) der analysierten Auxinphänotypen für die Bay-0 x Sha RIL-Population.....	41
Abb. 3.9: Schematische Darstellung der Lage auxinrelevanter QTL-Regionen.....	43
Abb. 3.10: Funktionelle Validierung der QTL-Region <i>W2,4-D3</i> .....	46
Abb. 3.11: Funktionelle Validierung der QTL-Region <i>W2,4-D4.2</i> .....	48
Abb. 3.12: Funktionelle Validierung der QTL-Region <i>WIAA2</i> .....	50
Abb. 3.13: Funktionelle Validierung der QTL-Regionen <i>H2,4-D5</i> und <i>HIAA5</i> .....	51
Abb. 3.14: Funktionelle Validierung der QTL-Region <i>GIR1</i> .....	53
Abb. 3.15: Funktionelle Validierung der QTL-Region <i>GIR2</i> .....	55
Abb. 3.16: Funktionelle Validierung der QTL-Region <i>GIR5</i> .....	56
Abb. 3.17: Inhibition des Primärwurzelwachstums durch Auxinapplikation.....	60
Abb. 3.18: Inhibition des TIHE-Phänotyps durch Hemmung der GA-Biosynthese.....	62
Abb. 3.19: Temperaturinduzierte Phänotypen der Kotyledonen.....	64
Abb. 3.20: Temperaturinduzierte Phänotypen der Primärblätter von Keimlingen.....	65
Abb. 3.21: Einfluss des Lichts auf die Hypokotylelongation.....	66
Abb. 3.22: <i>GIR2</i> -unabhängige Hypokotylelongation in Abhängigkeit von der Lichtqualität.....	68
Abb. 3.23: TIHE-Phänotyp der <i>elf3-1</i> -Mutante.....	69
Abb. 3.24: Erstellung einer Kartierungspopulation für die Feinkartierung des <i>GIR2</i> -Locus.....	71
Abb. 3.25: Feinkartierung des <i>GIR2</i> -Locus.....	72
Abb. 3.26: Schematische Darstellung zur Entstehung von <i>ghost</i> -QTLs.....	74
Abb. 3.27: Phänotypische Trennung des <i>GIR2</i> -Locus in <i>GIR2.1</i> und <i>GIR2.2</i> .....	75
Abb. 4.1: ELF3-Proteinstruktur verschiedener <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	84
Abb. 4.2: ELF3-Interaktionspartner.....	85
Abb. 4.3: Modell zur möglichen dosisabhängigen ELF3-Funktionsweise.....	87
Abb. 4.4: Schematische Darstellung der PIF4/5-vermittelten Regulation des Hypokotylwachstums.....	92



Abb. A.1: Statistische Analyse der 2,4-D-vermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzel von 20 resequenzierten <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	103
Abb. A.2: Statistische Analyse der IAA-vermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzel von 20 resequenzierten <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	104
Abb. A.3: Statistische Analyse der NAA-vermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzel von 20 resequenzierten <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	105
Abb. A.4 : Statistische Analyse der 2,4-D-vermittelten Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle von 20 resequenzierten <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	106
Abb. A.5: Statistische Analyse der IAA-vermittelten Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle von 20 resequenzierten <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	107
Abb. A.6: Statistische Analyse der NAA-vermittelten Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle von 20 resequenzierten <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	108
Abb. A.7: Statistische Analyse des TIHE-Phänotyps von 20 resequenzierten <i>A. thaliana</i> -Akzessionen.....	109
Abb. A.8: Statistische Analyse der physiologischen Auxinantworten der Akzessionen Bay-0 und Sha.....	110
Abb. A.9: Analysen der physiologischen Auxinantworten nach NPA-, TIBA-, PCIB- und IBA-Applikation der <i>A. thaliana</i> -Akzessionen Bay-0 und Sha und deren statistische Analyse.....	111
Abb. A.10: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der QTL-Regionen <i>W2,4-D3</i> und <i>W2,4-D4.2</i> .....	113
Abb. A.11: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der QTL-Region <i>WIAA2</i> .....	113
Abb. A.12: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der QTL-Regionen <i>H2,4-D5</i> und <i>HIAA5</i> .....	113
Abb. A.13: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der <i>GIR1</i> -Region.....	113
Abb. A.14: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der <i>GIR2</i> -Region.....	114
Abb. A.15: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der <i>GIR5</i> -Region.....	114
Abb. A.16: Statistische Analyse der auxinvermittelten Inhibition des Primärwurzelwachstums am <i>GIR2</i> -Locus.....	114
Abb. A.17: <i>GIR2</i> -vermittelte Inhibition des Hypokotylwachstums durch Auxinapplikation und die statistische Analyse.....	115
Abb. A.18: <i>GIR2</i> -unabhängige Hypokotylelongation durch GA <sub>3</sub> -Applikation und die statistische Analyse....	117
Abb. A.19: Statistische Analyse der PAC-vermittelten Inhibition des Hypokotylwachstums am <i>GIR2</i> -Locus.....	117
Abb. A.20: <i>GIR2</i> -unabhängige Hypokotylelongation durch Brassinosteroidapplikation und die statistische Analyse.....	118
Abb. A.21: <i>GIR2</i> -unabhängige Elongation etiolierter Hypokotyle durch Saccharoseapplikation und die statistische Analyse.....	118
Abb. A.22: Statistische Analyse temperaturinduzierter Phänotypen der Kotyledonen am <i>GIR2</i> -Locus.....	119
Abb. A.23: Statistische Analyse temperaturinduzierter Phänotypen der Primärblätter am <i>GIR2</i> -Locus.....	119
Abb. A.24: Statistische Analyse des Lichteinflusses auf das Hypokotylwachstums am <i>GIR2</i> -Locus.....	119
Abb. A.25: Statistische Analyse des Einflusses der Lichtqualität auf das Hypokotylwachstums am <i>GIR2</i> -Locus und für <i>elf3-1</i> .....	119
Abb. A.26: Statistische Analyse des TIHE-Phänotyps am <i>GIR2</i> -Locus und für <i>elf3-1</i> .....	120
Abb. A.27: Statistische Analyse der F1-Generation zum Erstellen der Kartierungspopulation von <i>GIR2</i> .....	120
Abb. A.28: Statistische Analyse der F4-Generation zur phänotypischen Trennung des <i>GIR2</i> -Locus.....	120

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 3.1: Zusammenfassung der QTL-Kartierung der Bay-0 x Sha RIL-Population mittels der MQM-Methode..... 39

Tab. A.1: Verwendete Wildtypakzessionen..... 98

Tab. A.2: Akzessionen der Kreuzungsanalysen..... 99

Tab. A.3: Verwendete HIFs..... 99

Tab. A.4: Verwendete Oligonukleotide..... 100

Tab. A.5: Genetische Interaktionen der identifizierten QTL-Regionen..... 112

## 1 Einleitung

Die Koordination von Entwicklungs- und Wachstumsprozessen bedarf der effizienten Kommunikation zwischen Zellen, Geweben und Organen. Dies kann durch ein chemisches Signal erfolgen, welches zur Regulation des Metabolismus, Wachstums und der Morphogenese dient. Die Idee der Kommunikation mittels chemischer Signale formulierte im späten 19. Jahrhundert der deutsche Botaniker Julius von Sachs. Solche chemischen Signale können ähnlich wie im tierischen System hormoneller Natur sein.

Eine ubiquitäre und für Pflanzen essentielle Hormonklasse sind die Auxine, deren Erforschung eine der ältesten Interessen der experimentellen Botanik ist. Bereits Charles und Francis Darwin führten erste Experimente zum Tropismus durch (Darwin und Darwin, 1880), welche auf den Ergebnissen von Theophil Ciesielski basierten (Ciesielski, 1872). Durch weitere Analysen zu Beginn des letzten Jahrhunderts gelang 1937 die Identifizierung der Indol-3-Essigsäure (IAA; Koeogl und Kostermans, 1934; Went und Thimann, 1937). Neben diesem endogenen Auxin höherer Pflanzen existieren diverse synthetische Herbizide mit auxinanaloger Wirkung, wie z. B. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und 1-Naphtylessigsäure (NAA). Diese werden in der strukturell heterogenen Phytohormonklasse der Auxine zusammengefasst, die nahezu alle Wachstums- und Entwicklungsprozesse regulieren.

Die asymmetrische Verteilung des Auxins in der Pflanze führt bspw. zur Regulation der Embryogenese, Morphogenese, Organogenese und Reproduktion (Leyser, 2006). Dies wird auf zellulärer Ebene durch den Einfluss der Auxine auf Zellteilung, -streckung und -differenzierung gewährleistet (Chapman und Estelle, 2009). Durch diese zentrale Rolle in der pflanzlichen Entwicklung ist Auxin direkt in Adaptationsprozesse involviert. So führt z. B. Phosphatmangel im Boden zu Veränderungen der Wurzelarchitektur, in dem es u. a. zur verstärkten Bildung von Seitenwurzeln sowie von Wurzelhaaren kommt. Dieser Prozess wird auxinabhängig reguliert (Koltai, 2012). Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von Auxin auf Adaptationsprozesse ist die Konkurrenz um photosynthetisch aktives Licht, wenn Pflanzen in sehr dichter Vergesellschaftung wachsen. Die gegenseitige Beschattung führt u. a. zum gesteigerten Wachstum der Sprossachsen. Auch hierbei handelt es sich um einen auxinabhängigen Phänotyp, dem Phototropismus (Sun *et al.*, 2013). Aber nicht nur in Adaptationsprozessen gegenüber abiotischen Stressfaktoren ist Auxin involviert, auch hat es bei z. B. der Herbivorie einen maßgeblichen Einfluss (Erb *et al.*, 2012). So können mittels der Auxinbiosynthese Ausgangsstufen des Abwehrstoffwechsels bereitgestellt werden (siehe auch Abb. 1.1; Ljung, 2013). Durch solche am Beispiel skizzierten direkten bzw. indirekten Auxinreaktionen wird eine gewisse Plastizität der pflanzlichen Entwicklung gewährleistet.

Aufgrund dieser Plastizität wird vielen Spezies eine sehr weite Verbreitung durch Besiedelung unterschiedlicher Habitate ermöglicht. Dies geschieht durch Anpassungsprozesse an den jeweiligen Lebensraum im Zuge der natürlichen Selektion. Das führt letzten Endes zur Manifestation genetischer Unterschiede. Daraus folgt, dass für Phänotypen, die relevant für die Anpassung an spezielle Lebensräume sind (wie bspw. oben beschrieben), im Genpool der jeweiligen Art eine natürliche genetische Variation existiert.

Eine Spezies mit einem weiten Verbreitungsgebiet und damit auch besonderer Anpassungsfähigkeit ist die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, die in gemäßigten Klimaten der gesamten nördlichen Hemisphäre beheimatet ist (Abb. 3.1A). Für diverse adaptionsrelevante Wachstumsphänotypen konnte zwischen *A. thaliana*-Akzessionen eine erhebliche natürliche Variation festgestellt werden (Alonso-Blanco und Koornneef, 2000; Koornneef *et al.*, 2004; Weigel, 2012).

Folgende Annahmen waren daher die Grundlage der vorliegenden Arbeit: (i) Auxin spielt eine zentrale Rolle in Adaptationsprozessen. (ii) Für die Anpassung an spezielle Lebensräume existiert eine natürliche genetische Variation im Genpool von *A. thaliana*. Daraus ergab sich die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit: Existiert auch für direkt durch Auxin vermittelte Wachstumsprozesse eine natürliche genetische und morphologische Variation im weltweiten Genpool in *A. thaliana*?

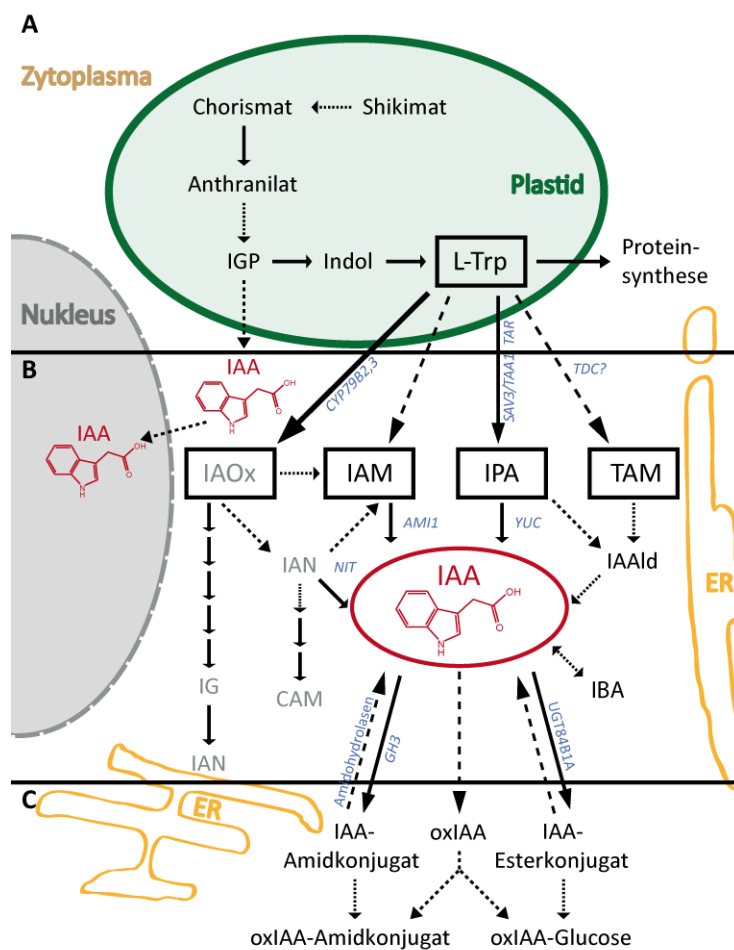
Um diese Fragestellung zu klären, wurden zwei verschiedene experimentelle Herangehensweisen angewendet: (i) Untersuchungen bezüglich direkter Auxineffekte auf das Wachstum, in dem Auxinapplikationsexperimente durchgeführt werden sollen. Sowie (ii) ein indirekter Ansatz, in dem die endogene Auxinkonzentration manipuliert wird. Ein Anstieg der endogenen Auxinkonzentration kann u. a. durch Temperaturerhöhung erfolgen, was wiederum zu gesteigerten Wachstumsraten führt (Gray *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 2011).

Um aber die Frage nach der Existenz natürlicher Variation bezüglich der Auxinphänotypen beantworten zu können, soll zunächst die Auxinbiologie zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit skizziert werden.

## 1.1 Auxin

### 1.1.1 Auxinbiosynthese und -metabolismus

Das natürliche Auxin IAA wird vorrangig über L-Tryptophan (L-Trp) als wichtiges Intermediat *de novo* synthetisiert (Abb. 1.1). Ausgehend von Chorismat, dem wichtigen Zwischenprodukt des Shikimatweges, erfolgt in den Chloroplasten die Anthranilatsynthese (Radwanski und Last, 1995). In mehreren enzymatischen Reaktionen entsteht über Indol-3-Glycerinphosphat (IGP) und Indol dann im letzten katalytischen Schritt L-Trp (Woodward und Bartel, 2005).



**Abb. 1.1: De novo-IAA-Biosynthese und -Metabolismus höherer Pflanzen**

(A) Die Biosynthese der IAA-Vorstufen wie IGP und L-Trp erfolgt in den Plastiden. Die wichtigste IAA-Vorstufe L-Trp wird mittels des Shikimatweges synthetisiert. (B) Die darauf folgenden vier möglichen Wege der L-Trp-abhängigen IAA-Biosynthese höherer Pflanzen finden im Zytoplasma statt: IAOx-, IAM-, IPA- und TAM-Weg. Involvierte Enzyme bzw. Gene der jeweiligen Biosynthese sind in blau dargestellt. Intermediate der Biosynthese können als weitere Vorstufen (in grau) wie bspw. IG und CAM des Abwehrstoffwechsels fungieren. (C) IAA kann als Konjugat mit As- oder Zuckerresten vorliegen bzw. wird zu oxIAA katabolisiert. Einige IAA-Konjugate dienen als Speicherform, welche zu freiem IAA hydrolysierbar sind.

Gefüllte Pfeile repräsentieren Wege, bei denen Enzyme, Gene und/oder Intermediate bekannt sind. Gestrichelte Pfeile zeigen hypothetische Wege, welche nur unzureichend definiert sind. CAM, Camalexin; IG, Indolglucosinolate; weitere Abk. siehe Text

Abb. wurde nach Ljung (2013) verändert.

Ausgehend von L-Trp zweigen vier Biosynthesewege ab (Abb. 1.1). Der erste vollständig aufgeklärte Biosyntheseweg ist nach dem wichtigen Zwischenprodukt Indol-3-Acetamid (IAM) benannt. Hierbei könnte es sich um ein Zwischenprodukt der IAA-Biosynthese aus Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) handeln (Pollmann *et al.*, 2002; Sugawara *et al.*, 2009; Novak *et al.*, 2012). Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die aus höheren Pflanzen identifizierte Enzymfamilie der IAM-Hydrolasen (AMI) für die Hydrolyse von IAM zu IAA verantwortlich ist (Mano und Nemoto, 2012).

Beim bereits erwähnten IAOx-Weg katalysieren die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP79B2 bzw. das Homologe CYP79B3 die Synthese von L-Trp zu IAOx (Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2000). Anschließend kann IAOx entweder zu IAM (Sugawara *et al.*, 2009) oder Indol-3-Acetonitril (IAN; Nafisi *et al.*, 2007; Sugawara *et al.*, 2009; Novak *et al.*, 2012) und letztendlich durch Nitrilasen (NIT) zu IAA synthetisiert werden (Normanly *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2003).

Der dritte, im Pflanzenreich hoch konservierte, Auxinbiosyntheseweg wird aufgrund des Intermediats Tryptamin als TAM-Weg bezeichnet (Zhao *et al.*, 2001), wobei TAM vermutlich ein Produkt der Trp-Decarboxylasen ist (TDC; Mano und Nemoto, 2012). TAM selbst wird *in vitro* zu N-Hydroxy-TAM hydroxyliert. Dieser Schritt soll durch die elf aus *A. thaliana* bekannten YUCCA (YUC)-Proteine katalysiert werden (Zhao *et al.*, 2001), welche der Enzymklasse der Flavin-Monooxygenasen ähnlich sind (Cheng *et al.*, 2006).

Neueste Studien zeigten, dass die primäre Auxinbiosynthese in *A. thaliana* mittels Indol-3-Pyruvat (IPA) als Intermediat erfolgt (Mashiguchi *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011). Das Schlüsselenzym dieses Biosyntheseweges ist SHADE AVOIDANCE 3/TRYPHTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (SAV3/TAA1) und dessen Homologe TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED (TAR). Diese katalysieren die Synthese von L-Trp zu IPA (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008). IPA seinerseits wird durch die Funktion der YUC-Familie zu IAA umgewandelt (Mashiguchi *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011). Inwiefern Indol-3-Acetaldehyd (IAAld) ein Intermediat dieses Weges darstellt, ist bisher unzureichend geklärt (Ljung, 2013).

Daneben wurde die Möglichkeit der *de novo*-Biosynthese unabhängig von L-Trp postuliert. Allerdings repräsentieren diese Experimente nach heutigen Gesichtspunkten keine eindeutigen Resultate (Woodward und Bartel, 2005; Ljung, 2013).

Alternativ zur *de novo*-Auxinbiosynthese kann in Pflanzen IAA durch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation von Indol-3-Buttersäure (IBA) gewonnen werden (Abb. 1.1; Ludwig-Mueller, 2000). Weiterhin besteht die Möglichkeit, IAA auch aus Esterkonjugaten mit Sacchariden bzw. Amidkonjugaten mit Peptiden oder Aminosäuren (As) zu hydrolysieren (Woodward und Bartel, 2005). Aus einigen dieser

Konjugate, wie bspw. IAA-Leu und IAA-Ala, kann mit Hilfe der Amidohydrolasen biologisch aktives IAA freigesetzt werden (LeClere *et al.*, 2002; Rampey *et al.*, 2004). Daneben existieren auch nicht-hydrolysierbare Konjugate, welchen eher eine Detoxifizierungsfunktion zukommt (Woodward und Bartel, 2005). Die Synthese der Amidkonjugate wiederum entsteht in Reaktion auf erhöhte zelluläre Auxinkonzentrationen. Dies wird durch die Familie der IAA-As-Synthasen GRETCHEN HAGEN 3 (GH3) vermittelt (Hagen und Guilfoyle, 1985; Staswick *et al.*, 2002; Kelley *et al.*, 2004).

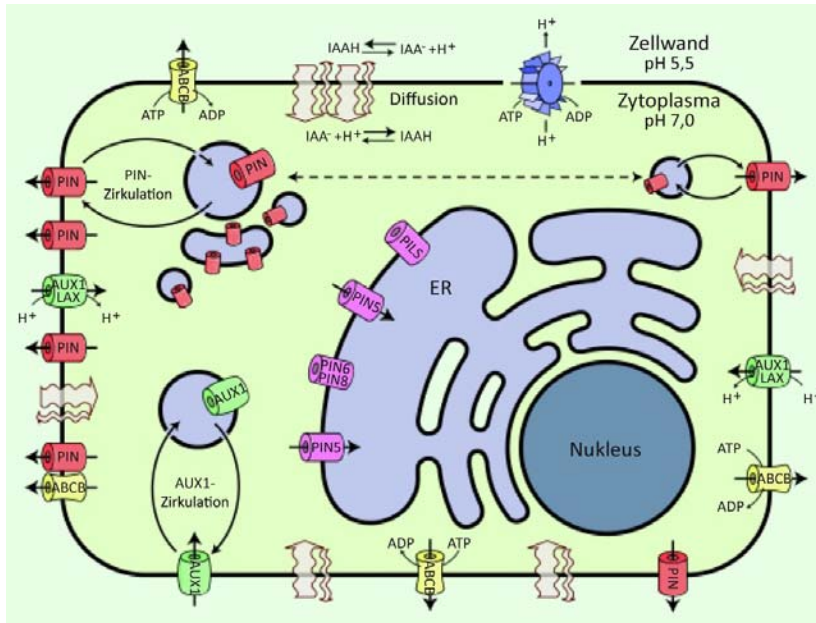
Die in geringerer Konzentration vorliegenden Saccharidkonjugate werden in *A. thaliana* durch die UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 84B1A (UGT84B1A) aus IAA und Glucose gebildet (Jackson *et al.*, 2001). Die exogene Applikation von NAA führt vorrangig zur Metabolisierung zu diesem Glycosylester, wohingegen 2,4-D nicht weiter metabolisiert wird (Hosek *et al.*, 2012). Allerdings sind die zu Grunde liegenden molekularen Details bisher nur unzureichend bekannt.

Zur permanenten Inaktivierung von IAA gibt es die Möglichkeit der nicht-decarboxylierenden Oxidation des Indolrings, wobei die beteiligten Enzyme bisher unbekannt sind (Abb. 1.1). Die zwei wichtigsten Degradationsprodukte sind 2-Oxoindol-3-Essigsäure (oxIAA) und oxIAA-Glucose (Oestin *et al.*, 1998; Kai *et al.*, 2007; Novak *et al.*, 2012).

### 1.1.2 Transport

Die Auxinbiosynthese erfolgt in erster Linie in meristematischem Gewebe, vor allem in Regionen des Sprossapex wie auch in jungen Blättern und sich entwickelnden Blattprimordien (Ljung *et al.*, 2001; Avsian-Kretchmer *et al.*, 2002). Von dort aus erfolgt der Transport in basipetaler Richtung. Entweder geschieht dies über längere Distanzen als Massenstrom über das Phloemgefäßsystem oder durch den zellulären polaren Auxintransport. Dahingegen erfolgt in den Wurzeln der polare Auxintransport sowohl acropetal im Zentralzylinder (Wilkins und Scott, 1968) als auch basipetal in der Epidermis (Davies und Mitchell, 1972; Tsurumi und Ohwaki, 1978).

Als Voraussetzung für den polaren Auxintransport muss die Plasmamembran passiert werden (Abb. 1.2). Beruhend auf der chemiosmotischen Hypothese liegt IAA im Apoplasten (pH-Wert ca. 5,5) hauptsächlich protoniert vor (Rubery und Shelldrake, 1974). Als protonierte Form kann IAA mittels passiver Diffusion die Plasmamembran passieren und liegt dann im Zytosol (pH-Wert 7,0) als membranundurchlässiges IAA-Anion vor (Rubery und Shelldrake, 1974; Raven, 1975; Goldsmith, 1977). Die passive Diffusion von IAA scheint allerdings nicht ausreichend für eine zelluläre Reaktion zu sein (Zazimalova *et al.*, 2010). Demnach muss IAA aktiv in und auch aus der Zelle heraustransportiert werden, welches mittels spezifischer Carrierproteine erfolgt.



**Abb. 1.2: Subzellulärer Auxintransport**

Der Auxintransport erfolgt entweder passiv entsprechend der chemiosmotischen Hypothese oder aktiv mittels spezifischer Carrierproteine (AUX1/LAX-Influxcarrier, PIN-Effluxcarrier und ABCB-Transportproteine). Lokalisation der Auxintransporter kann je nach Carrierprotein, Zelltyp und pflanzlichen Entwicklungsgrad in der Position variieren. ADP/ATP, Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat; weitere Abk. siehe Text

Abb. wurde nach Zazimalova *et al.* (2010) verändert.

Bisher wurden verschiedene Familien der Auxincarrierproteine identifiziert (Abb. 1.2). Die bedeutendsten Transmembranproteine sind dabei: AUXIN-RESISTANT 1/LIKE AUX 1 (AUX1/LAX) als Influxcarrier, die Transporter ATP BINDING CASSETTE (ABC) der MULTIDRUG RESISTANCE (MDR)-Subfamilie und als Effluxcarrier die PIN-FORMED (PIN)-Transporter (Bennett *et al.*, 1996; Luschnig *et al.*, 1998; Geisler *et al.*, 2005; Bailly *et al.*, 2008).

Der Auxinflux erfolgt auf Kosten des Protonentransportes an der Plasmamembran über vier Transporter, die Ähnlichkeit zu den As-Permeasen aufweisen: Ein AUX1- und drei LAX-Proteine (Abb. 1.2; Bennett *et al.*, 1996; Parry *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006). Diese sind abhängig vom analysierten Zelltyp symmetrisch oder asymmetrisch in der Plasmamembran lokalisiert (Swarup *et al.*, 2001; Kleine-Vehn *et al.*, 2006).

Innerhalb der Pflanze wird der polare Auxintransport in erster Linie durch die Funktionsweise als auch die subzelluläre Lokalisation der wichtigsten Effluxcarrier, der PIN-Proteine, gewährleistet (Abb. 1.2). Zur Familie der integralen PIN-Proteine zählen acht Mitglieder in *A. thaliana*. Die Subgruppe des PIN1-Typs weist eine polare, subzelluläre Lokalisation an der Plasmamembran auf und ist vorrangig für den polaren Auxintransport verantwortlich (Peer *et al.*, 2011). Die zweite Subgruppe der PIN-Effluxtransporter ist in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert und reguliert die subzelluläre Auxinhomöostase (Mravec *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2012). Daneben existieren weitere ER-lokalisierte Transportproteine, die PIN-LIKES (PILS), die an der intrazellulären Regulation der Auxinhomöostase beteiligt sind (Barbez *et al.*, 2012).



IAA wird auch durch die zur ubiquitären Subfamilie B der ABC-Transporter (ABCB-Transporter) zählenden P-Glycoproteine transportiert. Der Auxintransport kann dabei acropetal sowie basipetal erfolgen (Terasaka *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2007). Im Vergleich zu den PIN-Proteinen sind diese aber in der Regel nicht polar an der Plasmamembran lokalisiert (Geisler *et al.*, 2005; Petrusek *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007; Mravec *et al.*, 2008) und können sowohl als Import- als auch als Exportproteine fungieren (Geisler und Murphy, 2006; Yang und Murphy, 2009). Zwischen den beiden Effluxsystemen wurde eine komplexe funktionale Divergenz gezeigt. So sollen ABCB-Proteine die Spezifität wie auch die Rate des PIN-abhängigen Auxintransportes modulieren (Blakeslee *et al.*, 2007).

Die Modulation des Transportes und auch der Biosynthese führt zur Generierung lokaler Auxinmaxima. Diese resultieren in spezifischen Reaktionen der Pflanze. Dabei unterliegt die Regulation von Transport und Biosynthese der Auxinsignalkaskade, um die Spezifität der Auxinantwort zu gewährleisten.

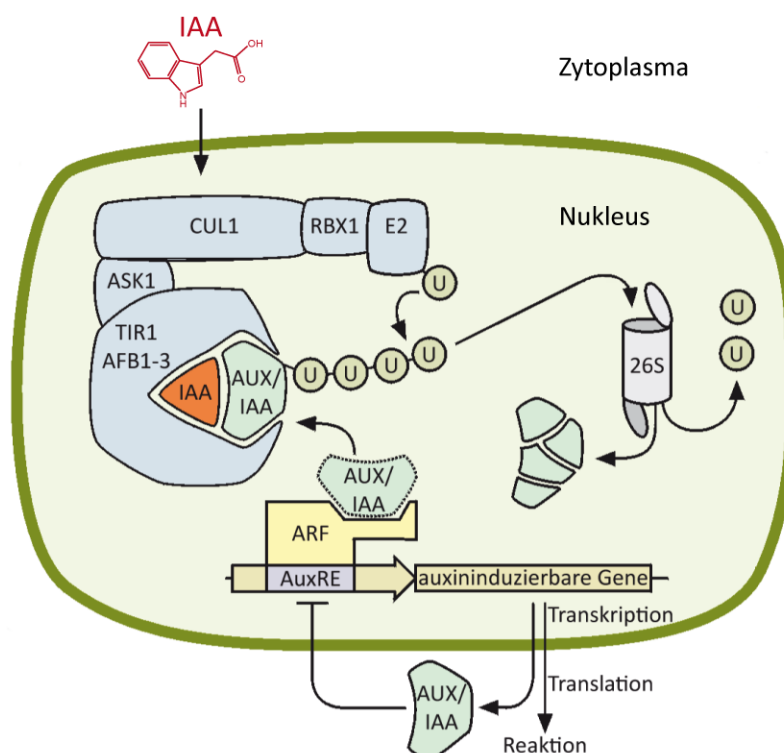
### 1.1.3 Auxinsignalkaskade

Die Auxinperzeption und -bindung erfolgt vorrangig durch einen Corezeptorkomplex im Nukleus (Abb. 1.3). Dieser besteht zum einen aus den auxinbindenden Proteinen TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) bzw. dessen Homologen AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB; Calderon-Villalobos *et al.*, 2010; Calderon-Villalobos *et al.*, 2012). Die TIR1/AFB-Proteine zählen zu den F-BOX PROTEINEN (FBP). Die FBPs sind zentraler Bestandteil der pflanzlichen E3-Ligase des Typs SUPPRESSOR OF KINETOCHORE PROTEIN 1 (SKP1)-CULLIN 1 (CUL1)-FBP-Komplex (SCF-Komplex; Gagne *et al.*, 2002). Die E3-Ligasen vermitteln die Polyubiquitinierung von Zielproteinen in Pflanzen. Zum anderen setzt sich der Corezeptorkomplex aus jeweils einem der 29 Auxin/INDOLIC ACETIC ACID (Aux/IAA)-Proteine zusammen (Calderon-Villalobos *et al.*, 2010; Calderon-Villalobos *et al.*, 2012). Die Aux/IAAs interagieren zusätzlich mit den DNA-bindenden AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)-Proteinen. Die 23 aus *A. thaliana* bekannten ARFs regulieren die Transkription durch Bindung an das DNA-Motiv des *Auxin Responsive Elements* (AuxRE; Okushima *et al.*, 2005; Wilmoth *et al.*, 2005).

Die intrazelluläre Erhöhung der Auxinkonzentration führt zur Bindung des Auxins an den Corezeptorkomplex. Dadurch kommt es zur verstärkten Interaktion von je einem TIR1/AFB-Protein und dem jeweiligen Aux/IAA-Protein (Calderon-Villalobos *et al.*, 2012). Das führt zur Polyubiquitinierung der Aux/IAAs, so dass diese für den proteolytischen Abbau mittels des 26S-Proteasoms markiert sind (26S; Gray *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2003). Aufgrund des Abbaus wird die Interaktion der Aux/IAA-Proteine mit den ARFs aufgehoben. Die ARF-Proteine kommen ihrer

Funktion als Transkriptionsregulatoren nach und die Expression bestimmter Gene wird induziert oder reprimiert, was auf zellulärer Ebene in einer spezifischen Reaktion resultiert (Quint und Gray, 2006; Chapman und Estelle, 2009). Die Spezifität der Reaktion wird durch die definierte zelluläre Zusammensetzung des jeweiligen TIR1/AFB-Aux/IAA-Corezeptorkomplex und der Interaktion mit dem spezifischen ARF-Protein gewährleistet. Dadurch existiert ein komplexes Regulationsnetzwerk der Auxinsignalkaskade.

Weiterhin existiert eine negative Regulationsschleife des Auxinsignalweges. Zu den innerhalb von wenigen Minuten regulierten Genen zählen u. a. die *Aux/IAAs* selbst (Abel und Theologis, 1996; Hagen und Guilfoyle, 2002; Woodward und Bartel, 2005). Damit wird der Signalweg durch die *de novo*-Synthese der *Aux/IAA*-Repressoren erneut inhibiert (Hagen und Guilfoyle, 2002; Woodward und Bartel, 2005). Darüber hinaus beeinflusst die Erhöhung der intrazellulären Auxinkonzentration über hundert weitere Gene sehr schnell in ihrer Expression (Nemhauser *et al.*, 2006). Diese intensive Expressionsregulation wurde neben dem im Labor maßgeblich genutzten Wildtyp Col-0 auch in weiteren Akzessionen ermittelt (Delker *et al.*, 2010). Dieser Vergleich führte zur Identifizierung verschiedener regulierter Gene in den analysierten Wildtypakzessionen (Delker *et al.*, 2010).



**Abb. 1.3: Auxinsignalkaskade**

Die Auxinperzeption erfolgt durch den SCF<sup>TIR1/AFB1-3</sup>-Aux/IAA-Corezeptorkomplex. Die IAA-Bindung führt zur proteolytischen Degradierung der Aux/IAAs mittels des 26S-Proteasoms (26S) und damit zur Aktivierung der ARFs. Daraufhin kommt es zu transkriptionellen Veränderungen, welche in einer spezifischen Reaktion der Pflanze resultieren.

ASK1, ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOG; E2, ubiquitin-konjugierendes Enzym; RBX1, RING-BOX1; U, Ubiquitin; weitere Abk. siehe Text

Abb. wurde nach Delker *et al.* (2008) verändert.

Ausgehend von der Hypothese, dass der Signalweg eines generellen Signalmoleküls wie Auxin, welcher verschiedene Stimuli integriert, eher in einer sehr konservativen Kontrolle der Genexpression resultiert, war die starke Ausprägung der natürlichen Variation dieser transkriptionellen Reaktion unerwartet (Delker *et al.*, 2010). Die Untersuchungen stehen in Kontrast zu Studien, die nur spezifische Stimuli, welche eher auf Adaptationsprozessen in bestimmten Habitaten beruhen, analysierten (Kliebenstein *et al.*, 2006; van Leeuwen *et al.*, 2007). Daher stellt sich die Frage, ob eine natürliche Variation für Auxinreaktionen existiert, und wenn dem so ist, wie die zu Grunde liegenden Determinanten identifiziert werden können.

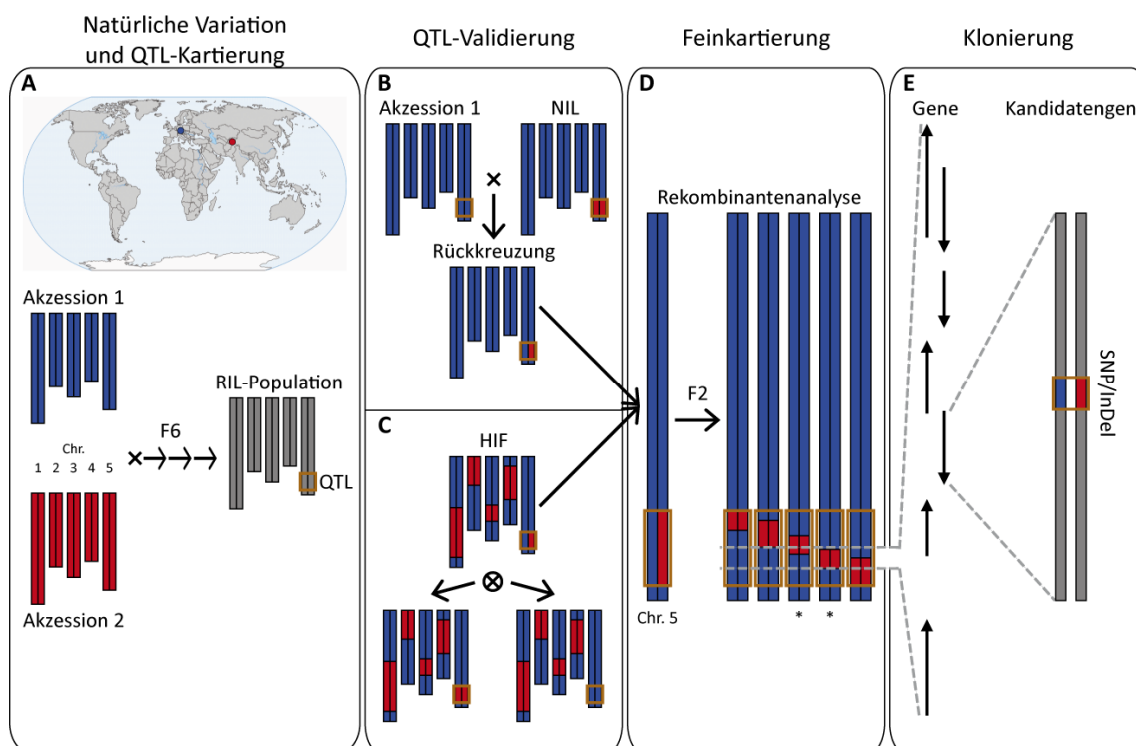
## 1.2 Die Nutzung der natürlichen Variation als genetische Ressource in Pflanzen

Seit der Identifizierung des Auxins als endogenes Signalmolekül in der Pflanze erfolgten diverse genetische Ansätze, um bestimmten Phänotypen die zu Grunde liegenden Gene (*Forward Genetics*) zuzuordnen. Außerdem erfolgten reverse Analysen (*Reverse Genetics*), die zur Identifizierung spezifischer Phänotypen bestimmter Gene führten. Allerdings weisen diese Ansätze auch Einschränkungen auf. Der artifiziell induzierte Mutantenansatz resultiert hauptsächlich in der Identifizierung und Klonierung von Genen, welche einen sehr starken Einfluss auf das zu untersuchende Merkmal aufweisen. Daher ist diese Herangehensweise z. T. unzureichend, um Gene mit geringfügigem Effekt bzw. deren Interaktion oder die zur Letalität führen zu identifizieren (Koorneef *et al.*, 2004). Des Weiteren erfolgten die meisten Mutantenansätze mit nur einer geringen Anzahl an Wildtypakzessionen, hauptsächlich Col, *Ler* und *Ws*, welche nur einen Bruchteil der genetischen Variation von *A. thaliana* repräsentieren. So zeigte der Vergleich verschiedener Wildtypakzessionen mit Col, dass ca. 10% der für Proteine codierenden Gene entweder abwesend oder nicht funktionell sind (Clark *et al.*, 2007). Außerdem weisen die hauptsächlich genutzten Wildtypakzessionen Col und *Ler* eher moderate Auxinreaktionen auf (Delker *et al.*, 2010). Daher ist davon auszugehen, dass einige funktionelle Allele, welche in der Auxinantwort involviert sind, fehlen und eher Akzessionen mit extremeren Phänotypen analysiert werden sollten.

Verschiedene *A. thaliana*-Akzessionen wurden bereits genutzt, um die natürliche Variation für diverse Merkmale zu analysieren wie bspw. die Samenkeimung, der Blühzeitpunkt oder Resistenz gegenüber abiotischen wie auch biotischen Stressfaktoren. Für einige dieser Merkmale konnten auch die zu Grunde liegenden genetischen Determinanten mittels Kartierung identifiziert werden (Koorneef *et al.*, 2004; Alonso-Blanco *et al.*, 2009; Weigel, 2012).

### 1.3 Quantitative Trait Locus-Analysen

Die Identifizierung der genetischen Determinanten für einige der analysierten Merkmale mit natürlicher Variation zeigte deren qualitative, monogene Vererbung (z. B. Jimenez-Gomez *et al.*, 2010; Todesco *et al.*, 2010). Der Großteil der Merkmale mit natürlicher Variation wird jedoch quantitativ vererbt (Koornneef *et al.*, 2004; Alonso-Blanco *et al.*, 2009). Um die genetischen Grundlagen von quantitativ vererbten Merkmalen zu identifizieren, erfolgt die Kartierung mittels *Quantitative Trait Locus* (QTL)-Analysen (Alonso-Blanco und Koornneef, 2000; Alonso-Blanco *et al.*, 2009; Weigel, 2012).



**Abb. 1.4: Strategie zur Identifizierung und Klonierung eines QTLs**

(A) Genetisch unterschiedliche Akzessionen (repräsentiert durch z. B. geographisch unterschiedliche Herkunft) dienen als Ausgangspunkt zur Generierung einer Kartierungspopulation wie bspw. die RIL-Population. QTL-Analysen führen zur QTL-Identifizierung (orangefarbenes Kästchen) z. B. auf Chromosom 5 (Chr. 5). (B) und (C) Die QTL-Validierung kann mittels des phänotypischen Vergleichs von (B) NILs oder (C) HIFs erfolgen. Die jeweiligen Linien weisen einen genetisch identischen Hintergrund auf und unterscheiden sich lediglich in der QTL-Region. (D) Die Feinkartierung der QTL-Region erfolgt mittels Rekombinantenanalyse von geselbsteten heterozygoten Linien an der QTL-Position. Diese Nachkommen werden phänotypisiert. Linien mit gesuchtem Phänotyp sind in diesem Bsp. mit Sternchen markiert und enthalten das Zielintervall (gestrichelte, graue Linie). (E) In der Regel führt die Feinkartierung zur Identifizierung mehrerer Kandidatengene (Pfeile repräsentieren Kandidatengene in verschiedener Orientierung), da nicht genügend Rekombinationsereignisse zwischen den Genen innerhalb der QTL-Region erfolgen. Daher wird häufig der Kandidatengenansatz verwendet, welches zur Identifizierung des kausalen quantitativen Gens und idealerweise des verantwortlichen SNPs bzw. InDels führen kann. Abk. siehe Text

Abb. wurde nach Reymond *et al.* (2007) verändert.

Ein QTL stellt eine genetische Region dar, welche in die Variation des zu untersuchenden Merkmals involviert ist. Hierfür muss die phänotypische Variation mit spezifischen Genotypen assoziiert werden. Der Genotyp wird mittels molekularer Marker bestimmt, welche in der Regel auf genomischen Insertionen bzw. Deletionen (InDels) oder auf *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) beruhen. Um einen molekularen Marker mit einem spezifischen Phänotyp zu assoziieren, sind mehrere verschiedene Genotypen notwendig, die an der entsprechenden Markerposition variieren. Deswegen wird für eine QTL-Analyse eine segregierende Kartierungspopulation benötigt, die eine Kollektion verschiedener Genotypen repräsentiert.

Zur Konstruktion solch einer Kartierungspopulation kann die allelische Diversität in natürlichen Varianten der Wildtypakzessionen einer Spezies genutzt werden (Abb. 1.4). Zunächst erfolgt die Kreuzung von mindestens zwei parental Akzessionen. Die resultierende F1-Generation ist an den allelisch diversen Loci der Parentalgeneration heterozygot. Die Nachkommen dieser Hybride zeigen aufgrund von meiotischen Rekombinationsereignissen vermischte parentale Genome. Prinzipiell könnte die phänotypische Variation der F2-Generation nach erfolgter Genotypisierung in der QTL-Kartierung verwendet werden. Allerdings ist die Fehlerquote der Phänotypisierung enorm, da falsch-positive und -negative Phänotypen der Individuen nicht erkannt werden können. Trotz alledem führte der Einsatz solcher F2-Populationen zur Identifizierung diverser QTL-Regionen in *A. thaliana* (Alonso-Blanco und Koornneef, 2000; Koornneef *et al.*, 2004; Weigel, 2012).

Um eine „unsterbliche“ Kartierungspopulation zu erstellen, werden die einzelnen F2-Linien mittels Einzelsamenvermehrung in die nächsten Generationen transferiert. Durch die Inzucht wird die Heterozygotie in jeder Generation um 50% reduziert und verschiedene Abschnitte des parental Genoms fixiert. Die resultierende Population aus Rekombinanten Inzuchtlinien (RI-Linien), zumeist in der 6. bis 10. Inzuchtgeneration, weist eine theoretische Heterozygotie zwischen 3 und 0,2% auf. Diese praktisch homozygoten Linien können in mehreren Replikaten sowie für verschiedene Merkmale und Umweltbedingungen untersucht werden, wobei zum einen der Fehler der Phänotypisierung verringert wird und zum anderen erneute Genotypisierungen hinfällig werden. Durch die einmalige Genotypisierung aller RI-Linien einer Population ist die allelische Zusammensetzung bekannt und kann mittels QTL-Kartierung auf deren signifikanten Einfluss auf das zu untersuchende Merkmal analysiert werden. Wenn das an einer bestimmten Markerposition vorhandene Allel einen signifikanten Einfluss auf die analysierte phänotypische Variation hat, dann handelt es sich um eine genomische Region, welche für die Merkmalsausprägung verantwortlich ist und als QTL bezeichnet wird (Koornneef *et al.*, 2004; Reymond *et al.*, 2007).

Da es sich hier allerdings um eine rein statistische Assoziation handelt, ist natürlich das Risiko der Identifizierung von falsch-positiven Loci gegeben. Daher muss die statistische Wahrscheinlichkeit der identifizierten QTL-Regionen validiert werden. Dies erfolgt mittels spezifischer Pflanzenlinien, welche sich in der QTL-Region allelisch unterscheiden. Hierbei handelt es sich bspw. um Nahezu Isogene Linien (NIL; Abb. 1.4) mit einem homozygoten genetischen Hintergrund eines der parentalen Allele. In der QTL-Region befindet sich die Introgression für das jeweilige andere parentale Allel (Koorneef *et al.*, 2004; Reymond *et al.*, 2007). Des Weiteren existieren Heterogene Inzuchtfamilien (HIF; Abb. 1.4) mit identischem, allerdings heterogenem genetischen Hintergrund außer in der zu analysierenden QTL-Region (Tuinstra *et al.*, 1997). Zu beobachtende Merkmalsunterschiede können in diesen Pflanzenlinien exakt auf die segregierende Region zurückgeführt werden, da sie sich nur in diesem Bereich unterscheiden.

Validierte QTL-Regionen können als monogen vererbte Loci gehandelt werden, obwohl sie zusammen mit anderen Loci für die Ausprägung eines quantitativ vererbten Merkmales verantwortlich sind. Die Validierung einer QTL-Region ist die Grundvoraussetzung für die weitere Feinkartierung (Abb. 1.4) der z. T. mehrere Mbp großen genomischen Regionen, um das entsprechende Kandidatengen zu identifizieren. Die Verifizierung des verantwortlichen Kandidatengens erfolgt mittels Komplementationsanalyse (Yano, 2001; Salvi und Tuberosa, 2005). Aufgrund der Kenntnis der genomischen Sequenzdaten verschiedener Akzessionen (Clark *et al.*, 2007; Zeller *et al.*, 2008) kann dieses Kandidatengen auch auf die verantwortliche InDel bzw. den einzelnen SNP als sogenanntes *Quantitative Trait Nucleotide* (QTN) zurückgeführt werden. Diese allelischen Polymorphismen sind von enormer Relevanz, um die Funktionsweise und die Regulation bzw. Interaktion des verantwortlichen Gens im Zusammenhang mit der untersuchten natürlichen Variation des Phänotyps besser zu verstehen (Maloof, 2003; Tonsor *et al.*, 2005).

### **1.4 Zielstellung der Arbeit**

Obwohl viele Aspekte des Einflusses von Auxin auf Wachstums- und Entwicklungsprozesse bekannt sind, bleiben weitere Fragen noch offen. Unklar ist z. B. noch immer, wie die zell- und gewebespezifischen Konzentrationsmaxima, Änderungen der Transkriptlevel sowie spezifische Antworten im Detail reguliert werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um komplexe Netzwerke mit verschiedenen Regulationsebenen. Damit ist eine Identifizierung mittels mutationsbasierter Ansätze aus den oben genannten Gründen nur begrenzt möglich.

Da Auxin eine zentrale Rolle in Adaptationsprozessen spielt, soll die genetische Variation von *A. thaliana* verwendet werden, um zu untersuchen, ob diese auch für direkte auxinvermittelte Wachstumsprozesse vorhanden ist. Wenn dem so ist, soll die genetische Variation von *A. thaliana* weiterhin genutzt werden, um die zu Grunde liegenden Determinanten zu identifizieren. Die wiederum können natürlich existierende Allele von bisher unbekanntem oder von bereits erwiesenen Komponenten der Auxinbiologie repräsentieren.

Dafür muss zunächst analysiert werden, ob für diverse Auxinphänotypen eine natürliche Variation in *A. thaliana* existiert. Anschließend soll die Frage nach der Vererbungsmodalität dieser genetisch bedingten, phänotypischen Unterschiede geklärt werden. Hierzu erfolgt die Segregationsanalyse von F<sub>2</sub>-Generationen, welche aus Kreuzungen von Akzessionen mit extremen Phänotypen generiert werden. Da so komplex regulierte phänotypische Antworten vermutlich auf einem komplizierten genetischen Netzwerk basieren, das aus einer großen Anzahl von Loci mit eher geringfügigeren Effekten besteht, sollen QTL-Kartierungen durchgeführt werden. Hierfür erfolgen die QTL-Kartierungen mittels einer der größten öffentlich verfügbaren RIL-Population Bay-0 x Sha. Diese ist aufgrund der großen Anzahl von Linien, die auch seltenere Rekombinationsereignisse aufzeigen, sowie der hohen Markerdichte ein geeignetes Material zur effizienten QTL-Kartierung mit minimaleren Zielintervallen. Die so identifizierten genomischen Regionen sollen mittels HIFs verifiziert und anschließend durch Feinkartierung und zusätzliche Charakterisierung weiterer Phänotypen entsprechende Kandidatengene und deren Funktionsweise identifiziert werden. Dieser genetische Ansatz dient nicht nur zur Identifizierung von natürlich existierenden Allelen von bisher unbekanntem oder bereits erwiesenen Komponenten der Auxinbiologie. Er wird auch zur Aufklärung der Fragestellung genutzt, ob konservativ regulierte Prozesse wie die Auxinbiologie einer gewissen adaptionspezifischen Plastizität unterliegen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die für die Versuche verwendeten Chemikalien und molekularbiologischen Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Laborchemikalien und Lösungsmittel: Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Nährmedien, Antibiotika und Phytohormone: Duchefa (Haarlem, Niederlande), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Starlab (Ahrensburg, Deutschland)

Oligonukleotide: Eurofins MWG Operon (Ebersbach, Deutschland)

Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer: Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

DNA-Polymerase und entsprechender 10 x Puffer: Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

DNA-Marker: Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

#### 2.1.2 Pflanzenmaterial

Alle verwendeten Wildtypkzessionen von *A. thaliana* wurden entweder vom *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC; Columbus, USA) bzw. *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC; Loughborough, UK) oder vom *Institute National de la Recherche Agronomique* (INRA; Versailles, Frankreich) bezogen (Tab. A.1). Zur Analyse der Vererbungsmodalität erfolgte die Generierung spezifischer F<sub>2</sub>-Generationen innerhalb der Arbeitsgruppe (Tab. A.2). Außerdem wurden sowohl die F<sub>9</sub>- als auch die F<sub>10</sub>-Generation der RIL-Population (CS/N57920) aus der Kreuzung Bayreuth-0 (Bay-0) x Shakdara (Sha) verwendet (Loudet *et al.*, 2002). Die Validierung der QTL-Regionen erfolgte mittels HIFs (Tuinstra *et al.*, 1997). Diese wurden entweder von C. Camilleri (INRA, Versailles, Frankreich) zur Verfügung gestellt oder innerhalb der Arbeitsgruppe generiert (siehe Kapitel 2.2.1.5, Tab. A.3). Zur Feinkartierung der *GIR2*-Region erfolgten entsprechende Kreuzungen von 84-S x 84-B sowie 163-S x 163-B und Generierung der Nachkommen innerhalb der Arbeitsgruppe. Die Analysen des Kandidatengens *ELF3* (*At2g25930*) erfolgten mit der *loss-of-function*-Mutante *elf3-1* (CS/N3787; Hicks *et al.*, 1996). Diese wurde von K. Hicks (Kenyon College, Gambier, USA) zur Verfügung gestellt.



### 2.1.3 Medium

Die Mediumzusammensetzung der *Arabidopsis Thaliana Solution* (ATS) erfolgte nach Estelle und Somerville (1987). Allerdings wurde dem Ansatz 1% (w/v) Saccharose und 0,5% (w/v) Agargel hinzugefügt. Für die Analysen zum saccharidvermittelten Hypokotylwachstum enthielt das Medium 90 mM Saccharose. Das Nährmedium wurde sterilisiert (20 min, 121°C, 2 bar) und nach Abkühlung erfolgte die Zugabe des entsprechenden Komplements.

Die Zusammensetzung des ½-Murashige-Skoog-Medium (½ MS) erfolgte entsprechend nach Murashige und Skoog (1962) mit 0,8% (w/v) Agarose.

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotidsequenzen für DNA-Amplifikationen und Sequenzierungsreaktionen sind in Tab. A.4 aufgeführt. Zur Verfügung standen die Oligonukleotidsequenzen zur Amplifikation der Mikrosatelliten-Marker (Loudet *et al.*, 2002). Des Weiteren wurden Oligonukleotide des Typs *Cleaved Amplified Polymorphism Site* (CAPS) verwendet. Basis zur Generierung der CAPS-Marker war die verfügbare Sequenzinformation der 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen (Clark *et al.*, 2007; Zeller *et al.*, 2008). Die entsprechenden Restriktionsenzyme wurden mittels der Software dCAPS ermittelt (Neff *et al.*, 1998). Der *Simple Sequence Length Polymorphism* (SSLP)-Marker für *ELF3* (Tab. A.4) wurde basierend auf den Sequenzdaten von Coluccio *et al.* (2011) generiert.

### 2.1.5 Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme für die Spaltung der mittels CAPS-Marker amplifizierten DNA-Fragmente sind in Tab. A.4 dargestellt.

## 2.2 Angewandte Methoden

### 2.2.1 Kultivierung, Phänotypisierung und Kreuzung von *A. thaliana*

#### 2.2.1.1 Allgemeine Kultivierung von *A. thaliana*

Die sterile, vertikal orientierte Anzucht der Keimlinge erfolgte in Klimaschränken (Percival, CLF Laborgeräte, Emersacker, Deutschland) bei ungefähr 50% relativer Humidität und 20°C. Die Belichtungsdauer betrug unter Langtag (LT)-Bedingungen 16 h (8 h Dunkelheit) mit einer Lichtintensität von 250 bis 300  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Unter diesen genannten Bedingungen erfolgten auch

Analysen im Dauerlicht (DL) bzw. Dunkelheit (D). Für Analysen temperaturinduzierter Phänotypen fand die Kultivierung bei 28°C statt. Anschließend wurden die Pflanzen auf Erde (Gemisch aus CL Ton Kokos und Vermikulit, Gebrüder Patzer, Sinntal-Altengronau, Deutschland) im Gewächshaus bei 18 bis 20°C und Tageslicht mit Zusatzbeleuchtung angezogen. Die relative Humidität betrug 55 bis 65%. Zum zügigeren Reifen der Schoten erfolgte die weitere Kultivierung im Gewächshaus bei 23 bis 25°C und Tageslicht mit Zusatzbeleuchtung. In diesem Fall betrug die relative Humidität 10 bis 50%.

### 2.2.1.2 Sterile Kultivierung von *A. thaliana*

Die standardisierte Anzucht erfolgte wie in Delker *et al.* (2010) beschrieben. Oberflächensterilisierte Samen wurden für mindestens vier Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert. Die anschließende Aussaat auf ATS- bzw. ½ MS-Medium mit je nach Angabe entsprechendem Komplement erfolgte unter sterilen Bedingungen. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), 24-epi-Brassinolid (24-epi-BL), Gibberellinsäure<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>), Indol-3-Essigsäure (IAA) und Indol-3-Buttersäure (IBA) wurden in 96% (v/v) Ethanol gelöst. In 1 N NaOH erfolgte die Aufnahme von 1-Naphtylessigsäure (NAA) und 1-N-Naphthylphtalaminsäure (NPA). Paclobutrazol (PAC) wurde in Aceton und p-Chlorphenoxy-Isobuttersäure (PCIB) sowie 2,3,5-Triiodobenzoessäure (TIBA) in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Zur Vermeidung von Positionseffekten wurden Kontrollmedium und mit Komplement angereicherte Petrischalen hintereinander platziert.

Zur Auswertung der Phänotypen wurde das Pflanzenwachstum mittels der Digitalkamera Nikon D90 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) oder mit Hilfe des Stereomikroskops SZX16 und der Kamera Color View III u (Olympus, Hamburg, Deutschland) dokumentiert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte entweder durch Messungen mit dem Lineal, mittels der Software ImageJ (NIH, *National Institutes of Health*) oder Root Detection (Ullrich, 2013). Je nach Angabe wurden immer die längsten Messwerte verwendet.

### 2.2.1.3 Phänotypisierung von *A. thaliana*

Wurzelwachstumsanalysen:

Keimlinge wurden auf ATS-Medium für drei (IAA- und IBA-Applikation) bzw. fünf Tage (2,4-D-, NAA-, NPA-, PCIB- und TIBA-Applikation) bei 20°C kultiviert. Dadurch sollte eine synchrone Keimung gewährleistet werden. Anschließend erfolgte der Transfer der Keimlinge auf Kontroll- bzw. je nach Angabe mit Komplement angereichertes Medium. Nach weiteren fünf (IAA- und IBA-Applikation)

bzw. drei Tagen (2,4-D-, NAA-, NPA-, PCIB- und TIBA-Applikation) wurden die Wurzellängen bestimmt. Zur Vermeidung der Photodegradierung des IAAs und IBAs erfolgte die Anzucht unter einem gelben langwelligen Lichtfilter (Stasinopoulos und Hangarter, 1990).

Wachstumsanalysen etiolierter Hypokotyle:

Keimlinge wurden auf Kontroll- bzw. angereichertem Medium (2,4-D-, IAA-, NAA- und NPA-Applikation) für fünf Tage bei 20°C im Dunkeln kultiviert. Eine achttägige Kultivierung der Keimlinge wurde auf Kontroll- bzw. mit 90 nM Saccharose angereichertem Medium bei 20°C im Dunkeln durchgeführt. Zur Gewährleistung einer synchronen Samenkeimung erfolgte nach der Aussaat ein vier- bis maximal zwölfstündiger Lichtimpuls. Dieser fand zur Vermeidung der Photodegradierung des IAAs unter einem gelben langwelligen Lichtfilter statt (Stasinopoulos und Hangarter, 1990).

Hypokotylwachstumsanalysen in Abhängigkeit von Brassinosteroid-, GA- und PAC-Applikation:

Zur Analyse des Einflusses der PAC-Applikation wurden Keimlinge auf ATS-Medium für drei Tage bei 20°C kultiviert. Dadurch sollte eine synchrone Keimung gewährleistet werden. Anschließend erfolgte der Transfer der Keimlinge auf Kontroll- bzw. mit PAC angereichertem Medium. Nach weiteren vier Tagen bei 20°C bzw. 28°C wurden die Hypokotyllängen bestimmt. Der Einfluss von GA<sub>3</sub> sowie 24-epi-BL wurde anhand zehn Tage alter Keimlinge analysiert. Diese wurden auf Kontroll- bzw. mit Komplement angereichertem Medium bei 20°C kultiviert.

Hypokotylwachstumsanalysen in Abhängigkeit von der Lichtqualität:

Die Kultivierung der Keimlinge erfolgte bei 20°C für vier Tage unter DL verschiedener Wellenlängen. Monochromatisches Blau-, Rot-, Dunkelrot- sowie Grünlicht wurde mittels LED SNAP-LITE (Quantum Devices, Barnereld, USA) generiert. Die Bestimmung der Lichtintensität und Wellenlängen erfolgte mit dem SPEC-UV/PAR Spektroradiometer (Apogee Instruments, Logan, USA). Fotos der Keimlinge wurden mittels der Digitalkamera Olympus digital Camedia C-700 (Olympus, Tokyo, Japan) aufgenommen.

Wachstumsanalysen temperaturinduzierter Phänotypen:

Die Kultivierung der Keimlinge erfolgte je nach Angabe unter LT oder DL bei 20°C oder 28°C. Nach zehn Tagen wurde das Hypokotylwachstum, die Länge der Stiele sowie der Blattwinkel der Keimblätter bestimmt. Bei zwölf Tage alten Keimlingen erfolgte die Messung der Petiolenlängen und Blattflächen der Primärblätter. Zur Bestimmung der Hypokotyllänge etiolierter Keimlinge wurden diese für fünf Tage bei 20°C oder 28°C angezogen.

### 2.2.1.4 Kreuzungsanalysen

Zur Kreuzung einzelner *A. thaliana*-Akzessionen bzw. -Linien wurde zunächst eine ungeöffnete Knospe präpariert, indem die Sepalen, Petalen sowie die Stamina mit einer Pinzette vollständig entfernt wurden (entspricht der ♀ Blüte). Daraufhin erfolgte der Transfer des Pollens vom zweiten Kreuzungspartner (entspricht der ♂ Blüte) auf das Pistill der zuvor präparierten Blüte. Zum Ausbilden von Schoten und Reifen der Samen wurden die Pflanzen unter LT kultiviert. Die Bezeichnung der innerhalb der Arbeitsgruppe generierten Kreuzungen erfolgte immer zuerst mit der Nennung des ♂ Kreuzungspartners.

### 2.2.1.5 Generierung von HIFs

Zur Generierung der HIFs (Tab. A.3) wurden die korrespondierenden RI-Linien, die idealerweise eine Restheterozygotie in der QTL-Region aufwiesen, analysiert. Durch Selbstung der RI-Linien 40, 130 und 155 kam es innerhalb dieser Region zur genotypischen Segregation nach den Mendelschen Gesetzen von 1:2:1 (Bay-0-Allel:Heterozygotie:Sha-Allel). Mittels Genotypisierung der segregierenden Regionen erfolgte die Identifizierung von Pflanzen, welche entweder homozygot für das Bay-0- oder für das Sha-Allel waren. Die HIF 40 wurde mittels der Oligonukleotide CAPSIV-At4g38980 F/R genotypisiert (Becker, 2011). Mit Hilfe der CAPSV-At5g15380 F/R, CAPSV-At5g27930 F/R und CAPSV-At5g42490 F/R erfolgte die Genotypisierung der HIF 130. Die Oligonukleotide CAPSIV-At4g32670 F/R wurden zur Genotypisierung der HIF 155 verwendet (Becker, 2011).

## 2.2.2 Statistische Auswertung

### 2.2.2.1 Deskriptive Statistik

Das arithmetische Mittel (Mittelwert, MW) sowie die Standardabweichung (STABW) wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) berechnet und graphisch dargestellt. Des Weiteren erfolgte mittels dieser Software die Kalkulation und graphische Darstellung des prozentualen Längen- bzw. Flächenwachstums sowie der Wachstumsinhibition und der prozentualen STABW in Abhängigkeit von der Behandlung. Dafür wurden folgende Formeln verwendet:

$$-\left(\frac{MW_{\text{behandelt}}}{MW_{\text{unbehandelt}}} * 100 - 100\right) = \text{Wachstumsinhibition} [\%]$$

$$\frac{MW_{\text{behandelt}}}{MW_{\text{unbehandelt}}} * 100 = \text{Wachstum} [\%]$$

$$\frac{STABW_{\text{behandelt}}}{STABW_{\text{unbehandelt}}} * 100 = \text{STABW} [\%]$$

Zur weiteren statistischen Auswertung der Datensätze erfolgte die Anwendung parametrischer Verfahren.

### 2.2.2.2 Parametrische Verfahren

Für den jeweiligen Genotyp lagen in der Regel zwei experimentell bestimmte Faktoren (behandelte vs. unbehandelte Keimlinge) vor. Da diese statistisch miteinander verglichen werden sollten, wurde die einfaktorielle Analyse der Varianz (ANOVA, *Analysis Of Variance*) verwendet. Zum Vergleich der prozentualen Wachstumsveränderungen zwischen den Genotypen wurde die mehrfaktorielle, speziell die zweifaktorielle, ANOVA verwendet (Delker *et al.*, 2010). Die Kalkulation der log-transformierten Daten erfolgte mittels der Software R/multtest (Pollard *et al.*, 2012). Da es sich hauptsächlich um sehr geringe phänotypische Unterschiede handelt, wurde das Signifikanzniveau \*\*\* sehr stringent auf  $p \leq 0,001$  bzw. \*\* auf  $p < 0,01$  gesetzt.

Zur Überprüfung der Normalverteilung von kontinuierlichen Daten wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,05$  gesetzt. Die Determination erfolgte mittels der Software Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA).

### 2.2.2.3 Bestimmung der Heritabilität im weiteren Sinne

Die Bestimmung der Heritabilität im weiteren Sinne ( $h_w^2$ ) für 2,4-D-, IAA- und NAA-vermittelte Wachstumsanalysen der Wurzel und des Hypokotyls sowie der temperaturinduzierten Hypokotyl-elongation (TIHE) erfolgte wie in Ullrich (2013) beschrieben.

$$h_w^2 = \frac{V_G^2}{(V_G^2 + V_E^2)}$$

Dabei stellt  $V_G^2$  die Varianzkomponente zwischen den Genotypen dar und  $V_E^2$  die verbleibende (Fehler-)Varianzkomponente. Die Kalkulation der Gesamtvarianz des jeweiligen Phänotyps erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA. Dabei wurde die Varianz aus den Phänotypen zwischen ( $V_Z^2$ ) und innerhalb ( $V_I^2$ ) der Genotypen der RIL-Population ermittelt. Daher ergab sich folgende Formel, wobei  $n$  die Anzahl der Replikate repräsentiert und  $V_E^2$  gleich  $V_I^2$  entspricht:

$$V_G^2 = \frac{(V_Z^2 - V_I^2)}{n}$$

Da es sich bei den analysierten Merkmalen um Verhältnisse von behandelten zu unbehandelten Pflanzen handelt, wurden die drei Replikate nachträglich bestimmt. Hierfür erfolgte die Auswahl von je drei behandelten und unbehandelten Pflanzen (3 von 10, 3 von 7, 3 von 4) und entsprechend wurden die Werte für die zufällig ermittelten Teilmengen bestimmt. Diese drei Replikate wurden dann genutzt, um  $h_w^2$  zu kalkulieren. Zur Korrektur dieser Teilmengen erfolgte die Bestimmung der Heritabilität 1000-fach für jeden Wachstumsversuch (Ullrich, 2013).

### 2.2.3 QTL-Kartierung

Für die QTL-Kartierung erfolgte die log-Transformation der prozentualen Phänotypdaten. Dabei wurden Linien ausgeschlossen, welche eine zu geringe Stichprobenanzahl ( $n < 10$ ) und/oder eine starke Varianz innerhalb der Linie aufwiesen ( $STABW > 20\%$ ). Zur statistischen Auswertung der analysierten Phänotypen wurde die R/qtl-Software verwendet (Broman, 2003), die die Möglichkeit der multiplen QTL-Kartierung beinhaltet (MQM, *Multiple QTL Mapping*; Arends *et al.*, 2010). Die Berechnung und Visualisierung der Daten sowie die Determination der Cofaktoren erfolgte nach Ullrich (2013). Zusammengefasst dargestellt: Relevante (Einzel-)QTL-Regionen wurden mittels *Composite Intervall Mapping* (CIM) detektiert (Zeng, 1994). Dafür erfolgte die Verwendung der *cim*-Funktion mit drei Covariablen, die mit einer Fenstergröße von 10 cM selektiert wurden. Als Signifikanzwert wurde die logarithmische Wahrscheinlichkeit (LOD, *Log Of Likelihood Of The Odds*)

angegeben. Dabei ist der 95 %ige Schwellenwert der Signifikanz mittels 1000-fachen genomweiten Permutationstests bestimmt worden (Ullrich, 2013).

Um potentielle Interaktionen zwischen den QTL-Regionen für das jeweilige Merkmal zu detektieren, wurde die *scantwo*-Funktion mit Haley-Knott-Regression verwendet (Haley und Knott, 1992). Die Kalkulation der gegebenen Wahrscheinlichkeiten der Genotypen erfolgte mittels der *calc.genoprob*-Funktion mit 1 cM Abstand und die Schätzung der Fehlerquote von 0,001 mit der Kosambi-Kartierungsfunktion (Kosambi, 1943). Dabei wurde die genomweite Signifikanz des LOD-Wertes mit der *scantwo*-Funktion mittels 10000-fachen Permutationstests bestimmt. Zur Evaluierung additiver oder interagierender Effekte erfolgte die weitere Verwendung der geschätzten LOD-Schwellenwerte, um starke und schwache Einflüsse mit der *calc.penalties*-Funktion zu kalkulieren (Manichaikul und Broman, 2009). Diese ist für die Generierung der *stepwiseqtl*-Funktion zur Identifizierung multipler QTL-Modelle notwendig (Broman und Sen, 2009). Letztendlich wurden die multiplen QTL-Modelle für jedes Merkmal mit der *makeqtl*- und *fitqtl*-Funktion genutzt, um die phänotypische Varianz des jeweiligen QTLs zu determinieren. Die Bestimmung des 95 %igen LOD-Konfidenzintervalls erfolgte mittels der *bayesint*-Funktion. Genomweite Interaktionen, welche mit der *scantwo*-Funktion identifiziert wurden, sind mit den finalen MQM-Modellen kombiniert worden. Die graphische Darstellung der relevanten (Einzel-)QTL-Regionen basiert auf den Resultaten der CIM-Kartierung.

Zur Generierung der Effektplots wurden die Phänotypdaten für jedes Merkmal und relevante QTL-Regionen an der Markerposition mit dem höchsten LOD-Wert dem entsprechenden parental Allel zugeordnet. Neben der graphischen Darstellung dieser mittels Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) wurde auch der MW kalkuliert und abgebildet.

### 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.4.1 Isolation genomischer DNA aus *A. thaliana*

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte in der Regel mit 70 bis 90 mg gemörserten Blattmaterial. Dieses wurde in 300 µl Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8,0; 500 mM NaCl) resuspendiert. Nach Zusatz von 24 µl 20% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) erfolgte eine zehnmündige Zentrifugation bei 14000 x g und Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation bei 12000 x g wurde das Pellet einmal mit gekühltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Die Pellets sind anschließend getrocknet und in 30 µl MilliQ H<sub>2</sub>O resuspendiert worden.

#### 2.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung rekombinanter DreamTaq™ Green DNA-Polymerase nach folgendem Protokoll (Sequenzen der Oligonukleotide siehe Tab. A.4).

Reaktionsansatz:

	1 µl	10 x PCR-Puffer
	0,75 µl	dNTPs [10 mM]
	1 µl	Oligonukleotide (F und R) [je 20 µM]
	0,05 µl	DreamTaq™ Green DNA-Polymerase [5 U/µl]
	0,75 µl	DNA-Extrakt
ad	10 µl	MilliQ H <sub>2</sub> O

Reaktionsbedingungen:

2 min	95°C	initiale Denaturierung	
30 s	95°C	Denaturierung	} 35 Zyklen
30 s	50 bis 60°C	Anlagerung	
1 min	72°C	Elongation	
10 min	72°C	finale Elongation	

#### 2.2.4.3 Sequenzierungsreaktion

Alle DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon als externe Auftragsarbeit durchgeführt. Die Auswertung der Nukleotidsequenzen erfolgte mit der Software Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australien).

#### 2.2.4.4 Restriktionsspaltung

Die Restriktionsspaltung der zuvor mittels CAPS-Markern (Tab. A.4) amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte in einem Endvolumen von 30 µl nach Herstellerangaben. Der Reaktionszeitraum umfasste ungefähr 16 h.



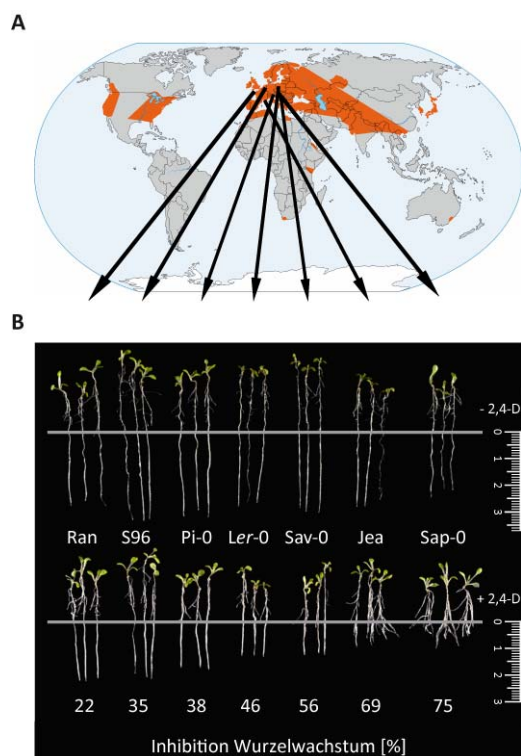
### 2.2.4.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die amplifizierten und/oder gespaltenen DNA-Fragmente wurden im Anschluss an die PCR und/oder den Restriktionsverdau im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zusammensetzung war wie folgt: 1% (w/v) Agarose; 0,3% (v/v) Serva DNA Stain G in 0,5 x TBE-Puffer (44,5 mM Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan; 44,5 mM Borsäure; 1 mM EDTA, pH 8,0). Mit Mikrosatelliten-Markern amplifizierte DNA-Fragmente wurden auf 3 %igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion und Dokumentation erfolgte unter ultraviolettem Licht. Zur Determination des vorliegenden Genotyps erfolgte der Größenvergleich mit dem GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Alternativ wurden die entsprechenden homozygoten, parentalen Linien mitgeführt. Anhand dieser wurde die Größe der amplifizierten Region und letztendlich der Genotyp bestimmt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Natürliche Variation physiologischer Auxinphänotypen

Die natürliche Variation in *A. thaliana* wurde bisher primär für bestimmte umweltbedingte Stressfaktoren analysiert (Kliebenstein *et al.*, 2006; van Leeuwen *et al.*, 2007). Komplex regulierte, spezifische Phytohormonantworten, die verschiedene interne und externe Stimuli integrieren, sind bislang kaum untersucht worden. Zur Analyse, inwieweit natürliche Variation bezüglich der Auxinantwort existiert, wurden verschiedene Akzessionen in einem klassischen Reaktionstest mit exogener Applikation des synthetischen Auxins 2,4-D getestet. Bereits für eine Auswahl von wenigen Akzessionen mit verschiedener geographischer Herkunft konnten Unterschiede in der 2,4-D-vermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzel beobachtet werden (Abb. 3.1). So reichte diese von einer eher mäßigen Inhibition von 22% bis hin zu 75% gegenüber unbehandelten Primärwurzeln.

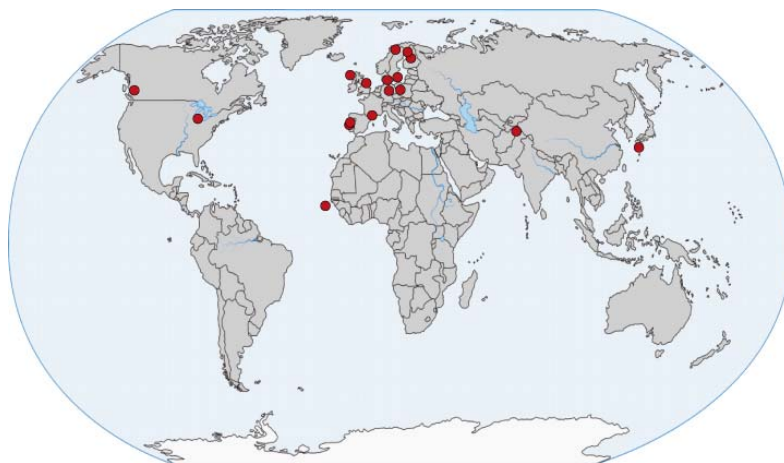


**Abb. 3.1: Natürliche Variation der 2,4-D-vermittelten Inhibition des Primärwurzelwachstums verschiedener *A. thaliana*-Akzessionen**

(A) Die geographische Verbreitung von *A. thaliana* ist in orange dargestellt. Pfeile geben die Herkunft der exemplarisch analysierten Akzessionen an. Abb. wurde nach Alonso-Blanco und Koornneef (2000) verändert. (B) Keimlinge wurden auf Kontroll- bzw. mit 30 nM 2,4-D angereichertem Medium für weitere drei Tage kultiviert. Die grauen Linien repräsentieren die Wurzellängen nach fünf Tagen. Abb. wurde nach Delker *et al.* (2008) verändert.

Eine detailliertere Analyse erfolgte mit 20 resequenzierten Akzessionen (Abb. 3.2). Diese repräsentieren eine maximale genetische Diversität innerhalb des Genpools von *A. thaliana* (Nordborg *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007). Zunächst wurden diese Akzessionen bezüglich der Inhibition des Primärwurzelswachstums durch die Applikation der synthetischen Auxine 2,4-D und NAA sowie des natürlichen Auxins IAA analysiert. Um eine eindeutige Differenzierung der Reaktionen der Akzessionen zu erreichen, wurden für NAA und IAA höhere Konzentrationen als für 2,4-D verwendet.

Die Behandlung mit den verschiedenen Auxinen führte zu unterschiedlich starken phänotypischen Antworten (Abb. 3.3A). Dabei waren die statistischen Vergleiche der Reaktionsunterschiede zwischen den Akzessionen überwiegend signifikant (zweifaktorielle ANOVA,  $p \leq 0,01$ ; Abb. A.1 bis A.3). Der Komplexität halber sind alle statistischen Angaben der zweifaktoriellen ANOVA detailliert im Anhang dargestellt. Die Applikation von 20 nM 2,4-D führte zu extrem unterschiedlichen Reaktionen. So betrug die Inhibition bei Van-0 ca. 10% und bei Tsu-1 hingegen ungefähr 60%. Bei den typischen Laborakzessionen Col-0 und Ler-1 handelt es sich um moderat reagierende Linien mit einer Inhibition von ca. 40 bis 50% (Abb. 3.3A). Die Behandlung mit 75 nM NAA führte zur Identifizierung der relativ schwach reagierenden Akzession Est-1 mit ca. 55% Inhibition im Vergleich zu Tsu-1 mit einer Reduktion des Primärwurzelswachstums von ungefähr 80% (Abb. 3.3A). Eine ähnliche Reaktion wurde für beide Akzessionen auch durch die Applikation von 75 nM IAA beobachtet (Abb. 3.3A). Obwohl die phänotypische Variation für die Behandlung mit IAA und NAA geringer als für die 2,4-D-Applikation ausfiel, konnten Akzessionen identifiziert werden, die für alle drei Auxinbehandlungen sehr sensitiv bzw. resistent waren. Keine Akzession zeigte eine konträre Reaktion bezüglich der verwendeten Auxine.



**Abb. 3.2: Geographische Herkunft von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen**

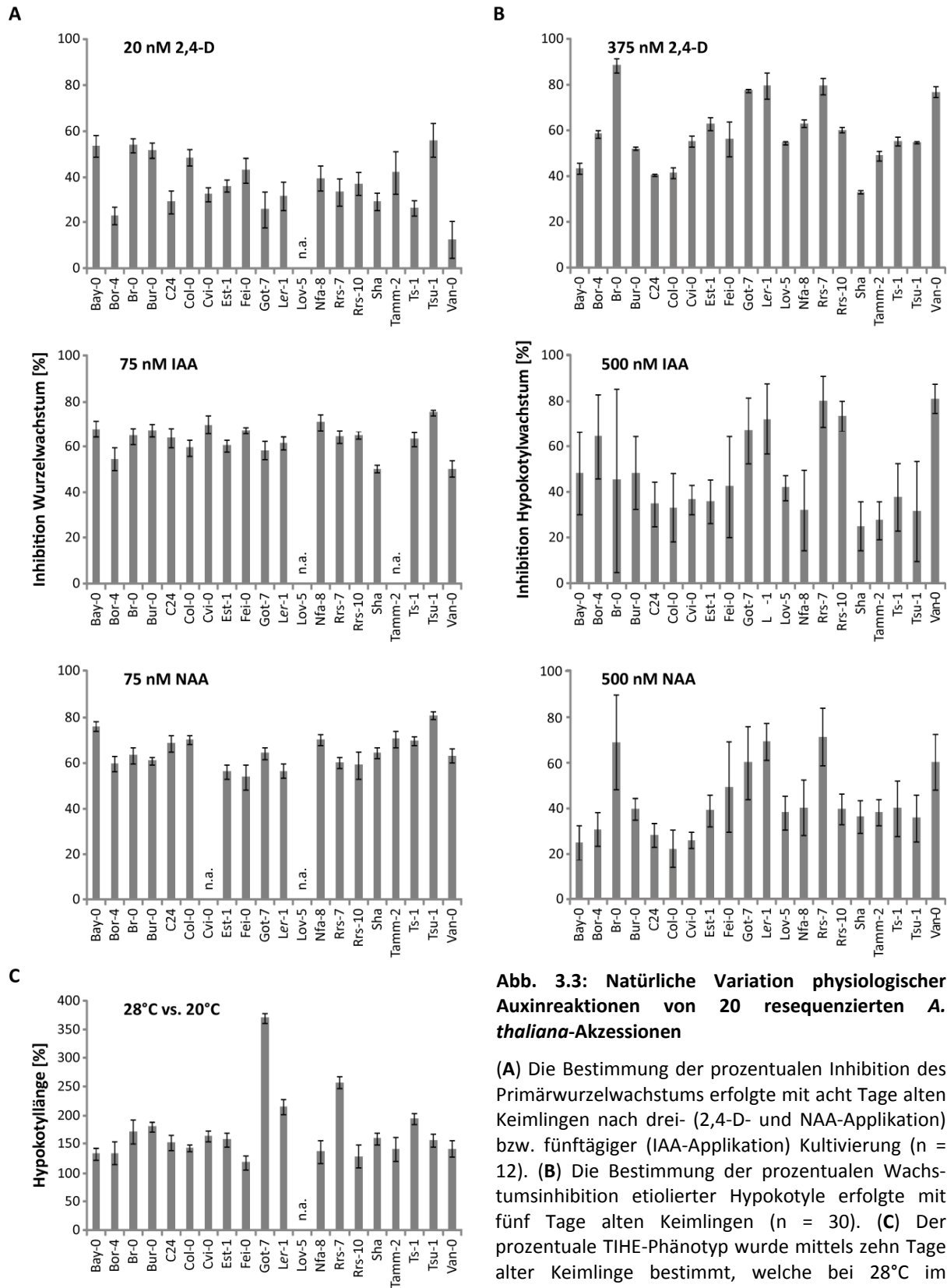
Rote Punkte repräsentieren die geographische Herkunft der detaillierter analysierten 20 resequenzierten Akzessionen (Clark *et al.*, 2007).

Neben dem Primärwurzelwachstum beeinflusst die Applikation von Auxinen auch das Streckungswachstum von Hypokotylen (Lincoln *et al.*, 1990; Leyser *et al.*, 1993; Collett *et al.*, 2000). Übereinstimmend mit der auxinvermittelten Inhibition des Primärwurzelwachstums führte die exogene Applikation zu phänotypischen Antworten, die bei den einzelnen Akzessionen unterschiedlich stark ausgeprägt waren (Abb. 3.3B). Die Differenzen zwischen den Akzessionen waren in der Mehrzahl der Fälle statistisch signifikant (zweifaktorielle ANOVA,  $p \leq 0,01$ ; Abb. A.4 bis A.6). Die durch 375 nM 2,4-D vermittelte Inhibition des Hypokotylwachstums etiolierter Keimlinge betrug für die am schwächsten reagierende Akzession Sha ungefähr 30%, wohingegen Br-0 als sensitivste Akzession eine Inhibition von 90% aufwies.

Die Applikationen von 500 nM IAA und 500 nM NAA führten zur Identifizierung von sehr schwach reagierenden Akzessionen mit einer Inhibition von 25 bis 30% (z. B. Sha bzw. C24) bis zu sehr sensitiven Akzessionen mit einer Reaktionsstärke von 70 bis 80% (Rrs-7). Allerdings war die Varianz für beide Auxinantworten innerhalb bestimmter Linien z. T. beträchtlich. So ist aufgrund dieser für Bor-4 keine konkrete Aussage möglich, ob ein konträres Reaktionsmuster vorlag (sensitiv für NAA- bzw. resistent für IAA-Applikation). Hingegen war bei den anderen Akzessionen für alle Auxinbehandlungen eine ähnliche Auxinantwort der Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle zu beobachten.

Zusätzlich zur exogenen Applikation sollte auch der Einfluss der Veränderungen der endogenen Auxinkonzentration auf Wachstumsprozesse analysiert werden, indem Keimlinge bei erhöhter Umgebungstemperatur von 28°C kultiviert wurden. Dies führt u. a. *downstream* zur Induktion der Auxinbiosynthese mit dem Anstieg der Auxinkonzentration, was in einem gesteigerten Längenwachstum der Zellen und letztendlich der Hypokotyle resultiert (temperaturinduzierte Hypokotyl-elongation, TIHE; Gray *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 2011). Im Vergleich dazu wurden für die exogene Applikation Auxinkonzentrationen verwendet, die in der Regel oberhalb des physiologisch optimalen Bereichs liegen und zur Wachstumshemmung führten. Aufgrund dessen handelt es sich bei sensitiven Akzessionen im Fall des TIHE-Phänotyps um gesteigerte Wachstumsraten, wohingegen dies für die Applikationsexperimente verringertes Primärwurzelwachstum bedeutet.

Für den TIHE-Phänotyp konnten unterschiedlich starke Reaktionen beobachtet werden (Abb. 3.3C). Die statistischen Vergleiche zwischen den Akzessionen waren überwiegend signifikant (zweifaktorielle ANOVA,  $p \leq 0,01$ ; Abb. A.7). Der TIHE-Phänotyp führte zur Identifizierung besonders schwach bzw. sensitiv reagierender Akzessionen wie Fei-0 mit einer Hypokotyllänge von ca. 120% bzw. Got-7 mit annähernd 400%. Interessanterweise reagierten Got-7 und Rrs-7 auch besonders sensitiv im Hinblick auf die auxinvermittelte Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle (Abb. 3.3B).



**Abb. 3.3: Natürliche Variation physiologischer Auxinreaktionen von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen**

(A) Die Bestimmung der prozentualen Inhibition des Primärwurzelwachstums erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen nach drei- (2,4-D- und NAA-Applikation) bzw. fünftägiger (IAA-Applikation) Kultivierung (n = 12). (B) Die Bestimmung der prozentualen Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle erfolgte mit fünf Tage alten Keimlingen (n = 30). (C) Der prozentuale TIHE-Phänotyp wurde mittels zehn Tage alter Keimlinge bestimmt, welche bei 28°C im Vergleich zu 20°C angezogen wurden (n = 12).

Fortsetzung siehe Seite 28

**Abb. 3.3: Natürliche Variation physiologischer Auxinreaktionen von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen (Fortsetzung)**

Die Bestimmung der prozentualen Wachstumsveränderungen erfolgte aus den Mittelwerten der Primärwurzel- bzw. Hypokotyllängen behandelter bzw. bei 28°C angezogener Keimlinge im Vergleich zur unbehandelten bzw. 20°C-Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar.

Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.1 bis A.7 dargestellt. Mit n. a. markierte Akzessionen wurden nicht analysiert.

Für Got-7 bleibt noch anzumerken, dass es sich nicht um eine generell auf Auxin sensitiv reagierende Akzession handelt. So war die 2,4-D-vermittelte Reaktion des Primärwurzelwachstums schwach bzw. moderat bezüglich der Behandlung mit den anderen beiden Auxinen (Abb. 3.3A). Got-7 und Rrs-7 scheinen besonders sensitiv auf die exogene und endogene Manipulation des Auxingehaltes im Hypokotyl zu reagieren.

Mittels der Analyse einer Kollektion von Akzessionen mit maximaler genetischer Diversität (Nordborg *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007) konnte gezeigt werden, dass eine natürliche Variation für physiologische Phänotypen der Auxinantwort existiert. Die vorliegenden Daten sollten als Grundlage zur Auswahl von Akzessionen für die Identifizierung der beteiligten Gene dienen.

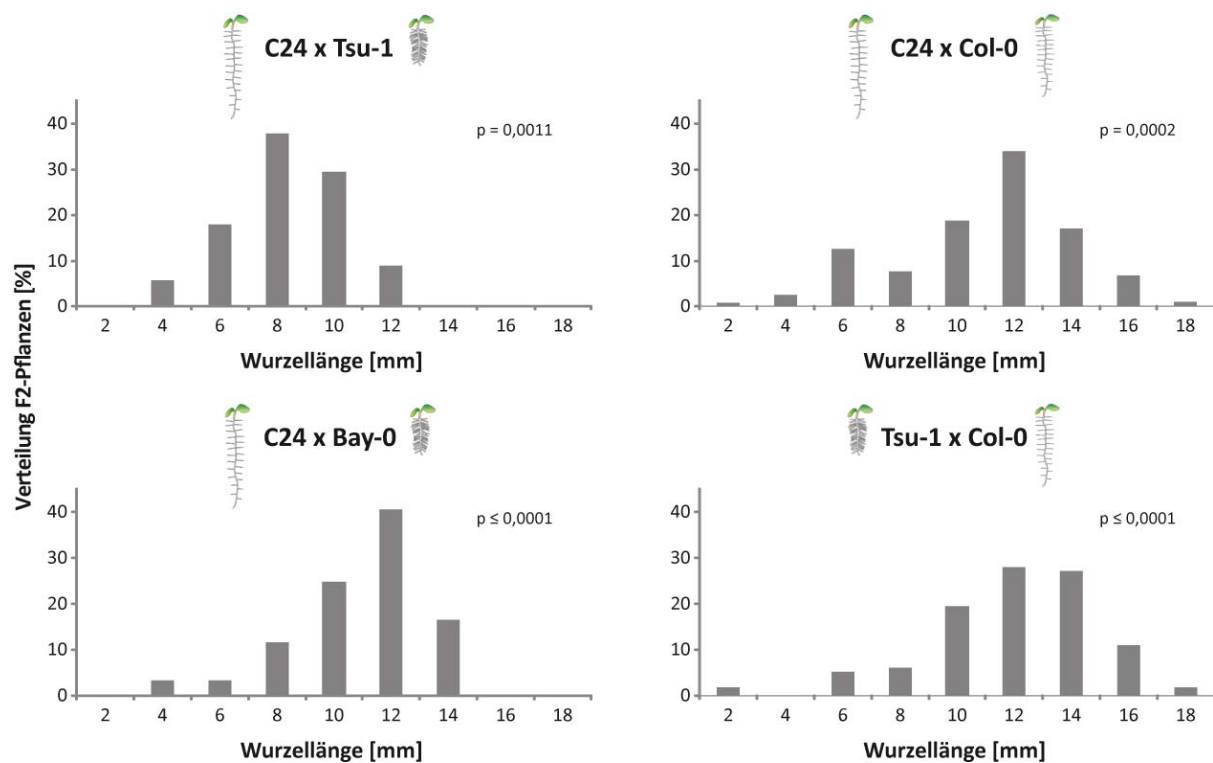
Die in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse wurden z. T. in Delker *et al.* (2008) (Abb. 3.1) und in Delker *et al.* (2010) (Abb. 3.3A und C) publiziert.

**3.2 Quantitative Vererbung der Auxinphänotypen**

Zur Analyse der genetischen Grundlagen der beobachteten, unterschiedlichen Ausprägung der Auxinantworten erfolgte die Kreuzung extrem reagierender Akzessionen. Anhand der Segregation der resultierenden F<sub>2</sub>-Generationen sollten Erkenntnisse über die Vererbungsmodalität der Auxinreaktionen erhalten werden. Je nach Anzahl der beteiligten Loci kann eine monogene oder oligo- bzw. polygene Vererbung vorliegen. So ist bei einem dominant-rezessiv vererbten Merkmal, das durch einen Locus kodiert wird, nach den Mendelschen Gesetzen eine 3:1 Segregation der dominanten und rezessiven Phänotypklasse zu erwarten. Sobald zwei ungekoppelte Loci beteiligt sind und keine Epistasie auftritt, erhöht sich die Anzahl der Phänotypklassen auf vier. Diese weisen ein Segregationsmuster von 9:3:3:1 auf. Daher erhöht sich mit steigender Anzahl der an der Merkmalsausprägung beteiligten Loci auch die Anzahl der beobachtbaren Phänotypen. Letztendlich

sind keine einzelnen Phänotypklassen mehr erkennbar, sondern es liegt eine kontinuierliche Verteilung der Phänotypausprägung vor (Falconer und Mackay, 1996).

Zunächst erfolgten Kreuzungen der schwach reagierenden Akzession C24 mit der sensitiven Akzession Tsu-1 und außerdem die Kreuzung mit Bay-0. Des Weiteren standen die F<sub>2</sub>-Generationen aus den Kreuzungen C24 sowie Tsu-1 mit Col-0 zur Verfügung. Die ausgewählten Testkreuzungen dienten nur zur ersten Indikation der Vererbungsmodalität und unterliegen daher keiner systematischen Vollständigkeit. Die F<sub>2</sub>-Generation aus der Kreuzung C24 x Col-0 zeigte andeutungsweise eine bimodale Verteilung (Abb. 3.4). Allerdings war für keine der analysierten F<sub>2</sub>-Generationen eine definierte 3:1 Segregation des 2,4-D-vermittelten Phänotyps zu ermitteln.



**Abb. 3.4: Häufigkeitsverteilungen der physiologischen 2,4-D-Reaktion verschiedener F<sub>2</sub>-Generationen**

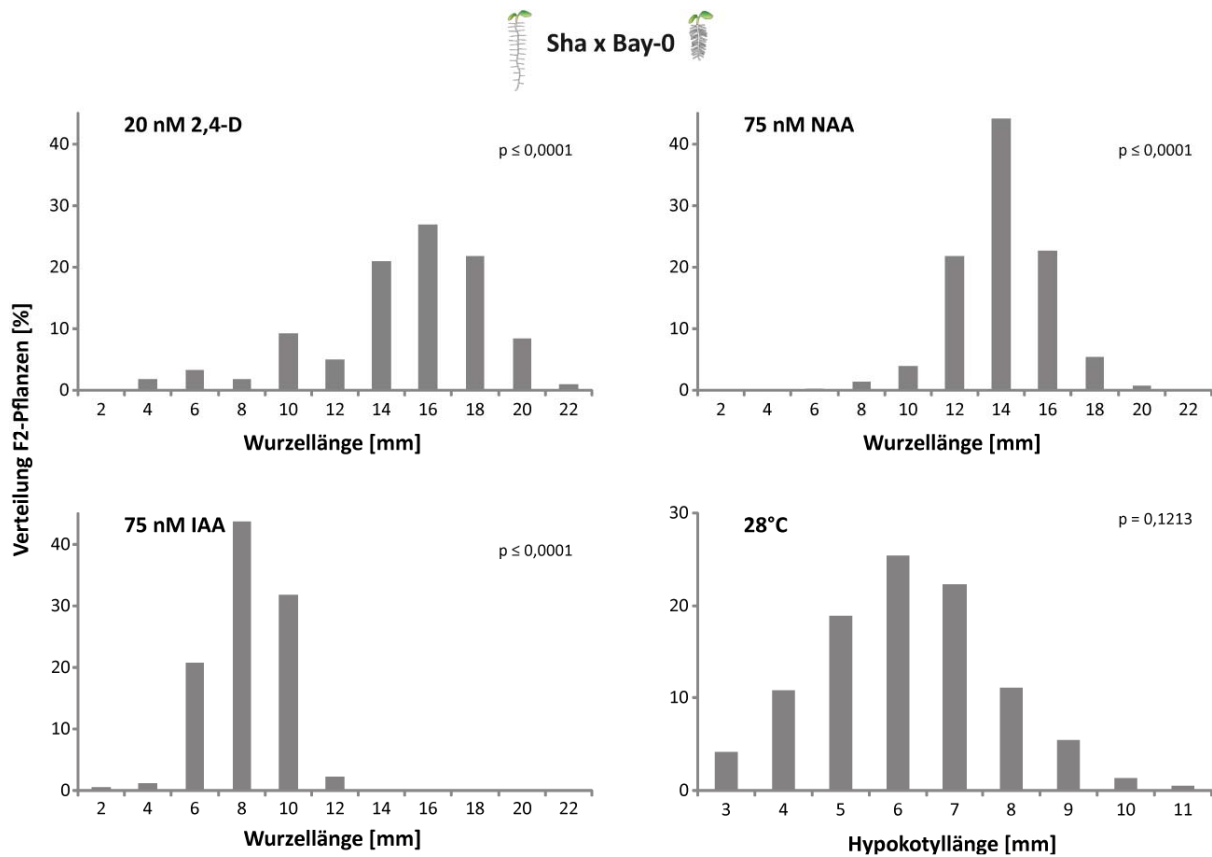
Aus den Kreuzungen der schwach reagierenden Akzession C24 mit den sensitiven Akzessionen Tsu-1 und Bay-0 bzw. mit der moderat reagierenden Akzession Col-0 resultierende F<sub>2</sub>-Generationen wurden bezüglich der 2,4-D-vermittelten Reaktion der Primärwurzel analysiert. Die Kultivierung der Keimlinge erfolgte auf mit 20 nM 2,4-D angereichertem ATS-Medium mit anschließender Bestimmung der Primärwurzellängen. Die prozentuale Häufigkeit der Wurzellängen wurde auf die Gesamtanzahl der jeweils analysierten F<sub>2</sub>-Individuen bezogen: C24 x Tsu-1 (n = 122), C24 x Bay-0 (n = 121), C24 x Col-0 (n = 119), Tsu-1 x Col-0 (n = 118). Der Test auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Tests (p-Wert > 0,05 indiziert eine Normalverteilung).

Die Präsenz mehrerer Phänotypklassen der analysierten F<sub>2</sub>-Generationen deutet auf eine zumindest oligogene Vererbung dieses Merkmals hin. Jedoch wiesen diese eine gewisse Schiefe auf, wodurch keine Normalverteilung vorlag (Shapiro-Wilk-Test,  $p \leq 0,01$ ). Ursache hierfür könnte die Beteiligung einer geringen Anzahl von Loci sein. Dies deutet sich bereits durch die bimodale Verteilung des 2,4-D-vermittelten Primärwurzelphänotyps der F<sub>2</sub>-Generation C24 x Col-0 an.

Alternativ kann die Schiefe auch durch die Größe der Stichprobenmenge bedingt sein. Die Phänotypisierung einer F<sub>2</sub>-Generation beruht auf Einzelpflanzen. Aufgrund dessen, dass F<sub>2</sub>-Pflanzen einzigartige Rekombinationsereignisse repräsentieren, kann der Stichprobenumfang nicht erhöht werden, um den Standardfehler der Phänotypisierung zu verringern. Deshalb ist eine weitere genetische Analyse dieser F<sub>2</sub>-Population nur bedingt anwendbar, um die kausalen genomischen Regionen für die Reaktionsunterschiede zu kartieren. Anstatt eine F<sub>2</sub>-Generation als Kartierungspopulation zu nutzen, können daher RI-Linien verwendet werden. Diese stellen aufgrund ihres nahezu homozygoten Zustandes fixierte Rekombinanten dar (Keurentjes *et al.*, 2007), welche mit einer ausreichenden Stichprobenmenge analysiert werden können. Eine solche RIL-Population aus der Kreuzung Bay-0 x Sha stand zu Beginn der Arbeit zur Verfügung. Sie repräsentiert eine der umfangreichsten, öffentlich verfügbaren Populationen mit einer relativ hoch auflösenden genetischen Karte zur präzisen Kartierung der an der Merkmalsausprägung involvierten Loci (Loudet *et al.*, 2002). Damit ist sie ein geeignetes Material zur Detektion der genetischen Determinanten der auxinvermittelten Reaktionsunterschiede verschiedener Akzessionen.

Zunächst musste allerdings die Vererbungsmodalität für die aus der Kreuzung Sha x Bay-0 resultierende F<sub>2</sub>-Generation detailliert analysiert werden (Abb. 3.5). Hierfür wurden die Primärwurzellängen der F<sub>2</sub>-Pflanzen nach 2,4-D- bzw. IAA- und NAA-Applikation analysiert und einzelnen Phänotypklassen zugeordnet. Da kein eindeutiges Segregationsmuster von 3:1 erkennbar war, kann auch hier von einer oligo- bzw. polygenen Vererbung ausgegangen werden. Des Weiteren wurde diese F<sub>2</sub>-Population bezüglich des TIHE-Phänotyps analysiert. Das Segregationsmuster dieses Phänotyps entsprach einer kontinuierlichen Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test,  $p > 0,05$ ), weshalb ein polygener Erbgang nahe liegt.





**Abb. 3.5: Häufigkeitsverteilungen der physiologischen Auxinreaktionen der Sha x Bay-0 F2-Generation**

Die F2-Generation aus der Kreuzung Sha x Bay-0 wurde bezüglich der Inhibition des Primärwurzelwachstums nach 2,4-D-, IAA- bzw. NAA-Applikation und des TIHE-Phänotyps getestet. Die prozentuale Häufigkeit der Primärwurzel- bzw. Hypokotyllängen wurde jeweils auf die Gesamtanzahl der analysierten F2-Individuen bezogen: 2,4-D- (n = 119), IAA- (n = 179) bzw. NAA-Applikation (n = 302) und Hypokotyllänge (n = 386). Der Test auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Tests ( $p$ -Wert  $> 0,05$  indiziert eine Normalverteilung).

Sowohl Abb. 3.4 als auch Abb. 3.5 bestätigen die Hypothese, dass es sich bei den beobachteten Auxinphänotypen der verschiedenen Akzessionen nicht um qualitative Reaktionsunterschiede, sondern um quantitativ vererbte Merkmale handelt. Um die genetischen Determinanten zu kartieren, werden vorzugsweise RIL-Populationen wie z. B. Bay-0 x Sha verwendet.

### 3.3 Phänotypische Charakterisierung der Akzessionen Bay-0 und Sha

Bevor die Phänotypisierung der Bay-0 x Sha RIL-Population erfolgte, wurden zunächst die parentalen Akzessionen Bay-0 und Sha bezüglich ihrer physiologischen Auxinantworten im Detail analysiert. Dies sollte für die Kartierung der kausalen genomischen Regionen dienen, um die Auxinkonzentration bzw. Bedingungen zu identifizieren, bei denen sich Bay-0 und Sha am deutlichsten in ihrer Reaktion unterscheiden.

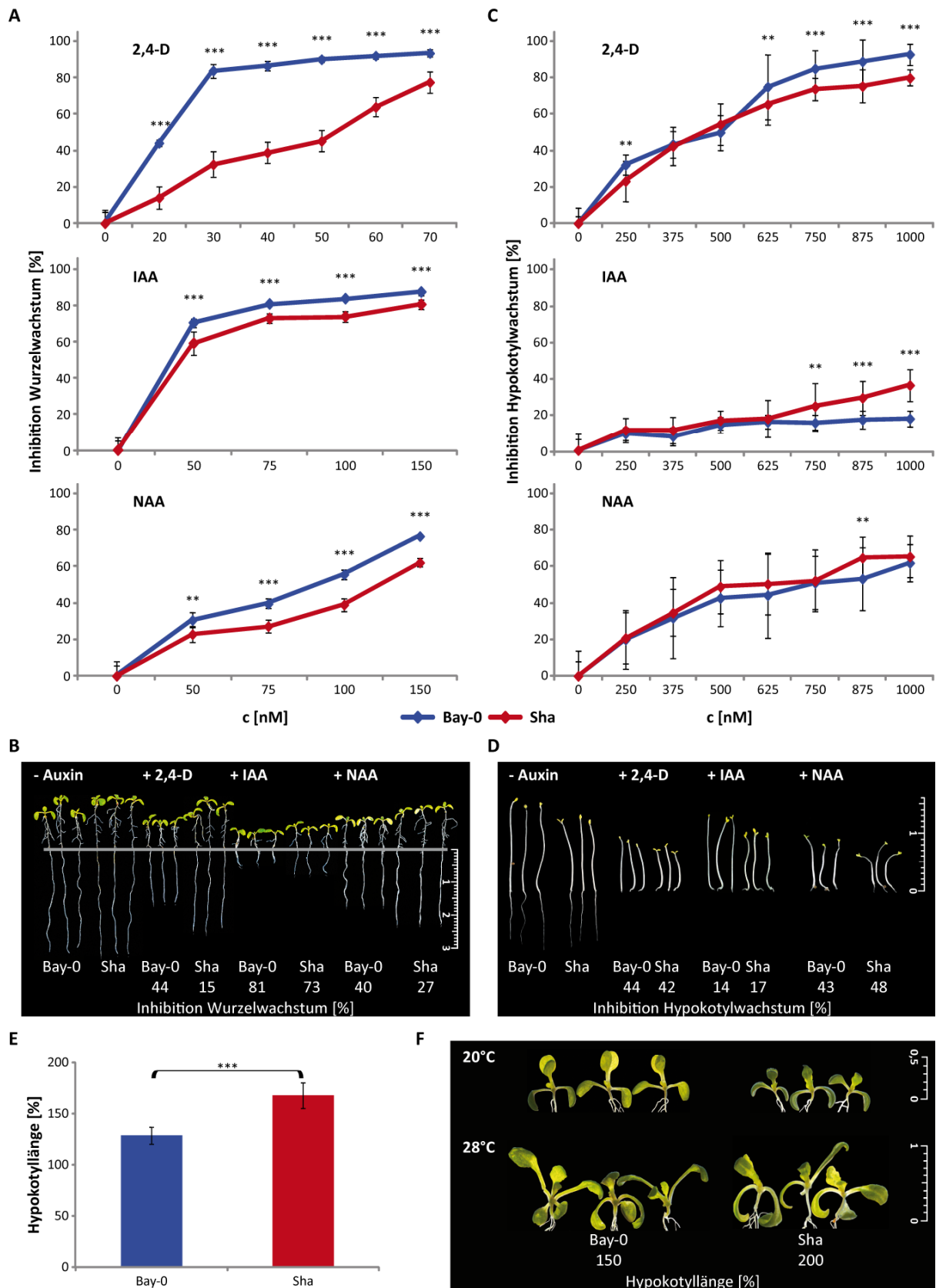


Abb. 3.6: Natürliche Variation physiologischer Auxinreaktionen der Akzessionen Bay-0 und Sha

Fortsetzung siehe Seite 33

**Abb. 3.6: Natürliche Variation physiologischer Auxinreaktionen der Akzessionen Bay-0 und Sha (Fortsetzung)**

(A) Die Bestimmung der prozentualen Inhibition des Primärwurzelwachstums erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen nach fünf- (2,4-D- und NAA-Applikation) bzw. dreitägiger (IAA-Applikation) Kultivierung (n = 17). (B) Fotos zeigen repräsentative, unbehandelte (- Auxin) Keimlinge sowie Pflanzen, welche auf 20 nM 2,4-D (+ 2,4-D), 75 nM IAA (+ IAA) bzw. 75 nM NAA (+ NAA) angezogen wurden. (C) Die Bestimmung der prozentualen Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle erfolgte mit fünf Tage alten Keimlingen (n = 30). (D) Fotos zeigen repräsentative, unbehandelte (- Auxin) Keimlinge sowie Pflanzen, welche auf 375 nM 2,4-D (+ 2,4-D), 500 nM IAA (+ IAA) bzw. 500 nM NAA (+ NAA) angezogen wurden. (E) Zur Bestimmung des prozentualen TIHE-Phänotyps erfolgte die Kultivierung zehn Tage alter Keimlinge bei 28°C im Vergleich zu 20°C (n = 12). (F) Fotos zeigen repräsentative Keimlinge. (B), (D) und (F) Der Größenstandard ist in cm angegeben.

Die Bestimmung der prozentualen Wachstumsveränderungen erfolgte wie in Abb. 3.3 beschrieben. Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.8 dargestellt (\*\* p-Wert  $\leq 0,001$ , \* p-Wert  $< 0,01$ ).

Zum einen wurde die Reaktion des Primärwurzelwachstums durch Applikation von Auxinen unterschiedlicher Konzentrationen untersucht. Der statistische Vergleich der Reaktionen von Bay-0 und Sha war signifikant für alle verwendeten 2,4-D-Konzentrationen (Abb. 3.6A und A.8). Bay-0 zeigte bereits bei 30 nM 2,4-D eine Inhibition von ca. 80%, während Sha als schwächer reagierende Akzession nur 30% Inhibition aufwies. Mit steigender Konzentration nahm dieser extreme Unterschied zwischen den beiden Akzessionen kontinuierlich ab, blieb aber weiterhin statistisch signifikant. Die Konzentration von 70 nM 2,4-D führte zumindest für Bay-0 zu einer nahezu 100%igen Wachstumsinhibition. Auch für die Applikation von NAA und IAA konnten signifikante Unterschiede in der physiologischen Reaktion von Bay-0 und Sha ermittelt werden (Abb. 3.6A und A.8). Im Gegensatz zur 2,4-D- und IAA-Applikation, wurde die maximal inhibierende NAA-Konzentration unter diesen experimentellen Voraussetzungen nicht erreicht. Es sollte lediglich die Konzentration ermittelt werden, bei der sich die beiden Parentalakzessionen am deutlichsten unterscheiden.

Zum anderen wurde auch die Reaktion der beiden Parentalakzessionen bezüglich der auf die Signaltransduktion antagonistisch wirkenden p-Chlorophenoxy-Isobuttersäure (PCIB) analysiert. Zusätzlich dazu erfolgten Analysen zur unterschiedlichen Reaktion durch Inhibition des polaren Auxintransportes (2,3,5-Triiodobenzoessäure, TIBA und 1-N-Naphthylphtalaminsäure, NPA) bzw. auf Applikation einer Vorstufe des aktiven IAA (Indol-3-Buttersäure, IBA). Alle genannten Behandlungen führten ebenfalls zu statistisch signifikanten Unterschieden in der Reaktion zwischen Bay-0 und Sha (Abb. A.9).

Neben den Analysen zur Wachstumsinhibition der Primärwurzel in den Parentalakzessionen wurde auch der Einfluss des Auxins auf das Hypokotylwachstum etiolierter Keimlinge in einer Kon-

zentrationsreihe untersucht. Die 2,4-D-Applikation führte zu statistisch signifikanten Unterschieden der Reaktionsstärke von Bay-0 im Vergleich zu Sha (Abb. 3.6C und A.8). Ausnahmen stellen die Konzentrationen von 375 und 500 nM 2,4-D dar, bei denen keine signifikanten Unterschiede ermittelt wurden. Mit steigender Konzentration nahm die Inhibition kontinuierlich zu, mit einer nahezu vollständigen Wachstumshemmung für beide Akzessionen auf 1000 nM 2,4-D im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.6C).

Im Gegensatz dazu war für die IAA-Applikation ein wesentlich geringeres Ausmaß der Wachstumsinhibition zu beobachten. Die Konzentration von 1000 nM IAA führte zu einer Wachstumshemmung der etiolierten Hypokotyle von ca. 40% in der Sha-Akzession im Vergleich von etwa 20% für Bay-0. Die Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den Akzessionen waren erst ab der Konzentration von 750 nM IAA statistisch signifikant (Abb. 3.6C und A.8). Auch für NAA konnte eine Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle gezeigt werden. Die Stärke der Inhibition verhielt sich intermediär zu der 2,4-D- und IAA-Behandlung. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Parentalakkzessionen konnten nur für die Konzentration von 875 nM NAA ermittelt werden (Abb. 3.6C und A.8). Es mussten wesentlich höhere Konzentrationen im Vergleich zur auxinvermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzel verwendet werden, um einen Effekt zu beobachten. Diese führte im Fall der IAA-Konzentration von 1000 nM nicht einmal zu einer deutlicheren Steigerung der Wachstumsinhibition. Demnach ist, wie bereits bekannt, das Primärwurzelwachstum wesentlich sensitiver gegenüber der exogenen Auxinapplikation als das des Hypokotyls (Tanimoto, 2005). Des Weiteren zeigte sich auch, dass die beiden Parentalakkzessionen drastischere Unterschiede im Primärwurzelwachstum aufwiesen (Abb. 3.6A und B). Dies wird besonders durch die 2,4-D-Applikation deutlich. Gleichwohl konnten auch im Hypokotylwachstum Unterschiede identifiziert werden (Abb. 3.6C und D).

Um die Funktion der Auxine beim Hypokotylwachstum besser verstehen zu können, wurde zusätzlich der TIHE-Phänotyp analysiert. Die Temperaturerhöhung führte zu einer relativen Hypokotyllänge von 170% in der Sha-Akzession. Im Vergleich dazu zeigte Bay-0 nur 130%. Dieser Unterschied in der Reaktionsstärke ist statistisch signifikant zwischen den beiden Akzessionen (Abb. 3.6E und A.8). Sowohl durch die endogene Manipulation (Abb. 3.6E) als auch durch exogene Applikation von zumindest NAA und IAA (Abb. 3.6C) konnten stärkere Phänotypen des Streckungswachstums des Hypokotyls in Sha ermittelt werden. Demnach ist das Hypokotylwachstum von Sha im Vergleich zu Bay-0 sensitiver gegenüber Veränderungen des Auxingehaltes.

Für die überwiegende Anzahl der analysierten Phänotypen zeigten bereits die Parentalakkzessionen Bay-0 und Sha statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 3.6). Diese unterliegen einer komplexen

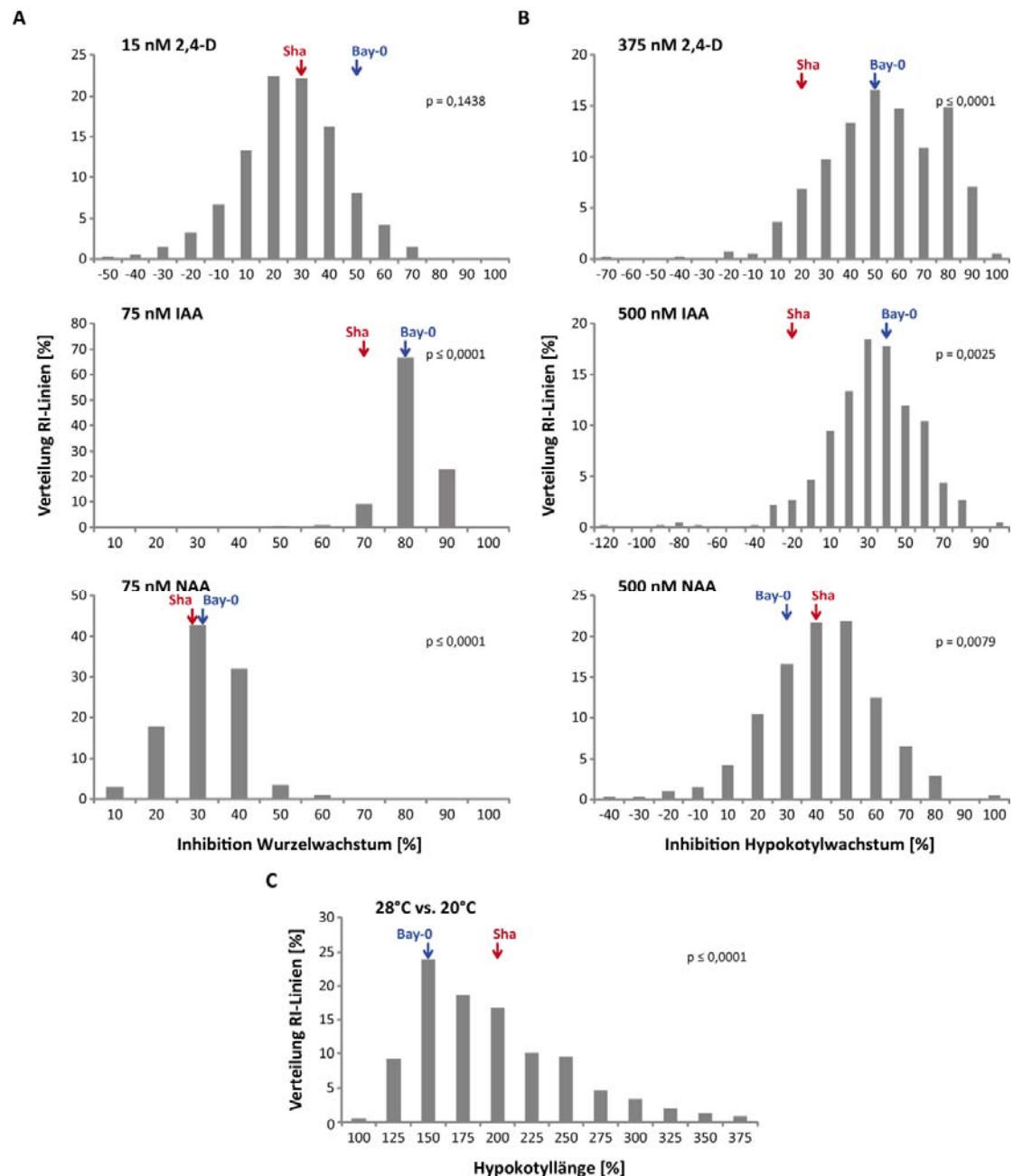
Vererbung (Abb. 3.5). Daher sollten die verantwortlichen genomischen Regionen mittels QTL-Analysen identifiziert werden. Dafür eignen sich besonders RIL-Populationen, wie solch eine für die Akzessionen Bay-0 und Sha zur Verfügung stand (Loudet *et al.*, 2002).

### 3.4 Phänotypische Charakterisierung der Bay-0 x Sha RIL-Population

Die Phänotypisierung der 411 Linien umfassenden Bay-0 x Sha RIL-Population wurde analog zu den bereits beschriebenen Experimenten durchgeführt. Die verwendeten Auxinkonzentrationen wurden aus den Reaktionsstärken der Parentalakzessionen bestimmt (Abb. 3.6). Hierbei handelte es sich idealerweise um Konzentrationen, bei denen der statistische Unterschied der Reaktionsstärken von Bay-0 und Sha signifikant war. Außerdem sollte eine moderate Inhibition vorliegen, um die Identifikation von eventuell stärkeren Phänotypen in der RIL-Population zu erlauben. Dieser Effekt wird als Transgression bezeichnet und beruht auf der Neukombination parental Allele durch Rekombinationsereignisse. Aufgrund der Neukombination der balancierenden Allele der Parentalakzession, welche die Reaktionsstärke vermitteln, wird der Effekt der transgressiven Variation in der RIL-Population deutlich (Falconer und Mackay, 1996).

Zum einen erfolgte für die gesamte Population die Bestimmung der Wachstumsinhibition der Primärwurzel durch Applikation von 15 nM 2,4-D, 75 nM IAA und 75 nM NAA (Abb. 3.7A). Zum anderen sollte die Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle durch Applikation von 375 nM 2,4-D, 500 nM IAA und 500 nM NAA untersucht werden (Abb. 3.7B). Zusätzlich dazu wurde die RIL-Population bezüglich des TIHE-Phänotyps analysiert (Abb. 3.7C). Linien, welche bei der Phänotypisierung eine zu geringe Stichprobenanzahl ( $n < 10$ ) und/oder eine starke Varianz innerhalb der Linie aufwiesen (Standardabweichung  $> 20\%$ ), wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die Behandlung mit 15 nM 2,4-D führte bei einzelnen RI-Linien zur Inhibition des Primärwurzelwachstums von bis zu 70% (Abb. 3.7A). Im Gegensatz dazu wurden auch RI-Linien identifiziert, welche auf der verwendeten Konzentration eine Elongation des Wurzelwachstums um nahezu 50% aufwiesen. Die verschiedenen Reaktionsstärken der RI-Linien zeigten eine kontinuierliche Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test,  $p \geq 0,05$ ). Eine deutliche Transgression konnte beobachtet werden, da viele RI-Linien einen stärkeren Phänotyp als die Parentalakzessionen aufwiesen. Dies spricht bereits dafür, dass mehrere Loci mit unterschiedlichem Beitrag an der Ausprägung des Merkmals beteiligt sein müssen.



**Abb. 3.7:** Häufigkeitsverteilung der physiologischen Auxinreaktionen in der Bay-0 x Sha RIL-Population

(A) Die Bestimmung der prozentualen Inhibition des Primärwurzelwachstums erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen nach fünf- (2,4-D- und NAA-Applikation) bzw. dreitägiger (IAA-Applikation) Kultivierung ( $n = 10$ ). (B) Die Bestimmung der prozentualen Wachstumsinhibition etiologierter Hypokotyle erfolgte mit fünf Tage alten Keimlingen ( $n = 30$ ). (C) Die Bestimmung des prozentualen TIHE-Phänotyps erfolgte durch Kultivierung zehn Tage alter Keimlinge bei 28°C im Vergleich zu 20°C ( $n = 15$ ).

Die Bestimmung der prozentualen Wachstumsveränderungen erfolgte wie in Abb. 3.3 beschrieben. Parallel zu allen RI-Linien wurden die Parentalakzessionen Bay-0 und Sha kultiviert. Ihre prozentualen Reaktionsstärken sind als Pfeile in den Diagrammen dargestellt. Die prozentuale Häufigkeit der Wachstumsveränderungen der Primärwurzeln bzw. Hypokotyle wurde jeweils auf die Gesamtanzahl der analysierten RI-Linien bezogen: Inhibition des Primärwurzelwachstums mittels 2,4-D- ( $n = 398$ ), IAA- ( $n = 400$ ) bzw. NAA-Applikation ( $n = 402$ ), Inhibition des Hypokotylwachstums mittels 2,4-D- ( $n = 319$ ), IAA- ( $n = 319$ ) bzw. NAA-Applikation ( $n = 319$ ) und TIHE ( $n = 398$ ). Der Test auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Tests ( $p$ -Wert  $> 0,05$  indiziert eine Normalverteilung).

Des Weiteren wurde die Heritabilität im weiteren Sinne (*Broad Sense Heritability*) für jedes Merkmal bestimmt (Tab. 3.1). Diese stellt dar, inwiefern der analysierte Phänotyp in seiner Ausprägung abhängig von der Umwelt bzw. vom Genotyp ist. Eine Heritabilität gegen null zeigt eine starke Abhängigkeit der Merkmalsausprägung von Umweltfaktoren. Dahingegen beruht der Phänotyp bei einer Heritabilität von nahezu eins fast vollständig auf dem Einfluss des Genotyps (Falconer und Mackay, 1996). Die Heritabilität im weiteren Sinne betrug 0,911 für die 2,4-D-vermittelte Wachstumsinhibition der Primärwurzel (Tab. 3.1). Demnach kann die Beeinflussung der phänotypischen Ausprägung durch Umweltfaktoren bzw. die Interaktion der Genotypen mit diesen in der Bay-0 x Sha RIL-Population vernachlässigt werden (< 10%). Allerdings wird der Umwelteinfluss auf die analysierten Merkmale besonders deutlich an den Parentalakzessionen, von denen ein nahezu homozygoter Zustand aller Allele im Genom angenommen wird. Diese zeigten in nachfolgenden Experimenten variable Reaktionsstärken im Vergleich zu Abb. 3.6. Allerdings wiesen sie immer die gleiche Tendenz auf, so dass sie als interne Kontrollen für alle nachfolgenden Experimente dienten.

Im Vergleich zur 2,4-D-Behandlung führte die IAA- und NAA-Applikation zu weniger starken Reaktionsunterschieden innerhalb der RIL-Population (Abb. 3.7A). Hier erfolgte die Verwendung einer Konzentration von IAA und NAA, welche nur einen inhibierenden Effekt auf das Primärwurzelwachstum aufwies. Auch für diese beiden Behandlungen konnte Transgression beobachtet werden. Im Fall der IAA-Applikation wurden keine RI-Linien identifiziert, welche einen stärkeren Phänotyp als die Parentalakzession Sha aufwiesen. Demnach kann angenommen werden, dass alle Loci, welche in der Vermittlung der schwächeren Reaktion involviert sind, dem Sha-Allel entsprechen. Die Heritabilität betrug für die IAA-vermittelte Wachstumsinhibition 0,845 und für die NAA-bedingte Reaktion 0,733 (Tab. 3.1).

Die Phänotypisierung der Population bezüglich der Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle durch Auxinapplikation führte zur Identifizierung verschiedener Reaktionsstärken der einzelnen RI-Linien (Abb. 3.7B). Obwohl weitaus höhere Konzentrationen verwendet wurden als für die Inhibition des Primärwurzelwachstums, konnte hier für einzelne RI-Linien ein fördernder Einfluss auf das Hypokotylwachstum beobachtet werden. Wie bereits beschrieben, ist die Sensitivität gegenüber exogenem Auxin unterschiedlich zwischen Hypokotyl und Primärwurzel (Tanimoto, 2005). Für alle drei Auxinbehandlungen wurde eine maximale Inhibition des Hypokotylwachstums von nahezu 100% identifiziert. Außerdem konnten im Vergleich zu den Parentalakzessionen wesentlich stärkere Reaktionen beobachtet werden. Die Heritabilität betrug 0,912 für die 2,4-D-vermittelte Wachstumsinhibition, 0,713 für die IAA- und 0,740 für die NAA-bedingte Reaktion (Tab. 3.1).

Die Phänotypisierung der gesamten Population bezüglich des TIHE-Phänotyps führte zur Identifizierung einzelner RI-Linien, die nur ein geringfügig längeres Hypokotyl aufwiesen (Abb. 3.7C). Wiederum zeigten andere RI-Linien eine Hypokotyllänge von bis zu 375%. Wie in Abb. 3.7C ersichtlich ist, zeichnet sich auch dieser Phänotyp durch transgressives Verhalten einzelner RI-Linien aus. Die Heritabilität dieses Merkmals beträgt 0,922 (Tab. 3.1).

Aufgrund der verschiedenen Reaktionsstärken in Abhängigkeit vom jeweiligen Genotyp der RI-Linien kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei allen sechs physiologischen Auxinphänotypen und dem TIHE-Phänotyp um quantitativ vererbte Merkmale handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen und um die zu Grunde liegenden genetischen Regionen zu identifizieren, erfolgten QTL-Analysen für die sieben analysierten Phänotypen.

### 3.5 Identifizierung von auxinrelevanten QTL-Regionen

Die QTL-Kartierung stellt eine statistische Analyse basierend auf dem Kopplungsungleichgewicht der Allele an Markerpositionen und am QTL dar. Demnach weicht die Vererbung der Allele an der mit dem QTL gekoppelten Markerposition von der 50 %igen zufälligen Wahrscheinlichkeit ab (Falconer und Mackay, 1996). Sehr vereinfacht dargestellt wird im Rahmen einer QTL-Kartierung das Auftreten eines Phänotyps mit der statistisch relevanten Existenz eines bestimmten Allels, der Allelfrequenz, an einem Locus korreliert.

Zur statistischen Analyse wurde die R/qtl-Software verwendet (Broman, 2003), die die Möglichkeit der multiplen QTL-Kartierung beinhaltet (*Multiple QTL Mapping, MQM*; Arends *et al.*, 2010). Obwohl mehrere Möglichkeiten der QTL-Kartierung existieren, handelt es sich bei der MQM-Methode um die präziseste. Sie integriert als Intervallkartierungsmethode auch den Einfluss von weiteren Markern, sogenannten Cofaktoren (Jansen, 1993; Jansen und Stam, 1994). Dadurch werden die statistischen Effekte eventuell vorhandener, zusätzlicher QTL-Regionen auf die Kartierung minimiert. Die Berechnung und Visualisierung der Daten erfolgte nach dem Skript von Ullrich (2013) (siehe Kapitel 2.2.3). Als Signifikanzwert wurde die logarithmische Wahrscheinlichkeit (*Log Of Likelihood Of The Odds, LOD*) angegeben. Dabei ist der Schwellenwert der Signifikanz mittels genomweiter Permutationstests bestimmt worden. Wenn der LOD-Wert an einer spezifischen Markerposition größer als der Schwellenwert ist, dann handelt es sich um eine statistisch signifikante Kopplung des Markers mit der QTL-Region. Eine weitere wichtige Größe ist der Prozentsatz der phänotypischen Varianz, der durch den QTL vermittelt wird. Je größer dieser Wert ist, desto stärker beeinflusst die QTL-Region die Ausprägung des quantitativ vererbten Merkmals.



Tab. 3.1: Zusammenfassung der QTL-Kartierung der Bay-0 x Sha RIL-Population mittels der MQM-Methode

Behandlung	Heritabilität ± SF	QTL	Chr.	Marker	95%-Konfidenzintervall [cM]	LOD-Wert*	Phänotypische Varianz [%]	Validierung
<b>2,4-D</b>	0,911 ± 0,005	W2,4-D3	3	MSAT3.65	55 – 61	6,137	5,450	+
		W2,4-D4.1	4	NGA8	7 – 31	4,117	3,614	n. a.
		W2,4-D4.2	4	MSAT4.9	54 – 66	8,421	7,581	-
	IAA	W2,4-D5	5	MSAT520037	62 – 76	6,979	6,229	n. a.
		W/IAA1	1	NGA128	54 – 67	3,107	2,694	n. a.
		W/IAA2	2	MSAT2.7	42,9 – 49	9,530	8,584	-
<b>NAA</b>	0,845 ± 0,009	W/IAA5	5	JV6162	74 – 77	17,564	16,601	n. a.
		W/NAA1	1	F5114	42 – 86	2,666	2,805	n. a.
		W/NAA2	2	IND216199	45 – 60	4,429	4,709	n. a.
	NAA	W/NAA4	4	NGA8	7 – 62	2,886	3,041	n. a.
		H2,4-D1.1	1	T1G11	0 – 8	2,843	3,208	n. a.
		H2,4-D1.2	1	IND1136	37 – 65	4,147	4,724	n. a.
<b>2,4-D</b>	0,912 ± 0,006	H2,4-D3	3	MSAT318406	43 – 65	3,841	4,366	n. a.
		H2,4-D5	5	NGA151	13 – 26	7,415	8,652	+
		H/IAA1	1	T1G11	0 – 11	5,923	6,812	n. a.
	IAA	H/IAA3	3	MSAT3.32	24 – 45	4,620	5,262	n. a.
		H/IAA5	5	NGA151	15 – 21	9,633	11,388	+
		H/NAA1	1	IND4992	0 – 18	2,939	4,036	n. a.
NAA	H/NAA5	5	NGA151	3 – 28	2,429	3,322	n. a.	
	GIR1	1	MSAT108193	24 – 28	11,942	8,731	+	
	GIR2	2	MSAT2.41	34 – 36	24,056	18,924	+	
<b>TIHE</b>	0,922 ± 0,004	GIR5	5	NGA139	32 – 44	9,221	6,633	-

Mit n. a. markierte QTL-Regionen wurden nicht weiter analysiert. + bzw. – bedeutet positive bzw. keine Validierung der genomischen Regionen. SF bedeutet Standardfehler.

\* Der 5 %ige LOD-Schwellenwert wurde individuell für jedes QTL-Modell mittels 10000-fachen Permutationstest bestimmt.

Für die QTL-Kartierung wurden die phänotypischen, log-transformierten Daten der sechs auxinvermittelten Merkmale bzw. des TIHE-Phänotyps (Abb. 3.7) und die öffentlich verfügbaren Genotypen der Bay-0 x Sha RIL-Population verwendet (Loudet *et al.*, 2002). Zur Anwendung kam sowohl die eindimensionale QTL-Kartierung als *Composite Interval Mapping* (CIM) als auch die MQM-Methode. Beide Methoden der QTL-Kartierung führten zur Identifizierung verschiedener QTL-Regionen bezüglich der auxinvermittelten Wurzelwachstumsinhibition (Abb. 3.8 und 3.9, Tab. 3.1). Die Namensgebung erfolgte entsprechend dem analysierten Organ (W = Wurzel, H = Hypokotyl), dem verwendeten Auxin und der chromosomalen Position.

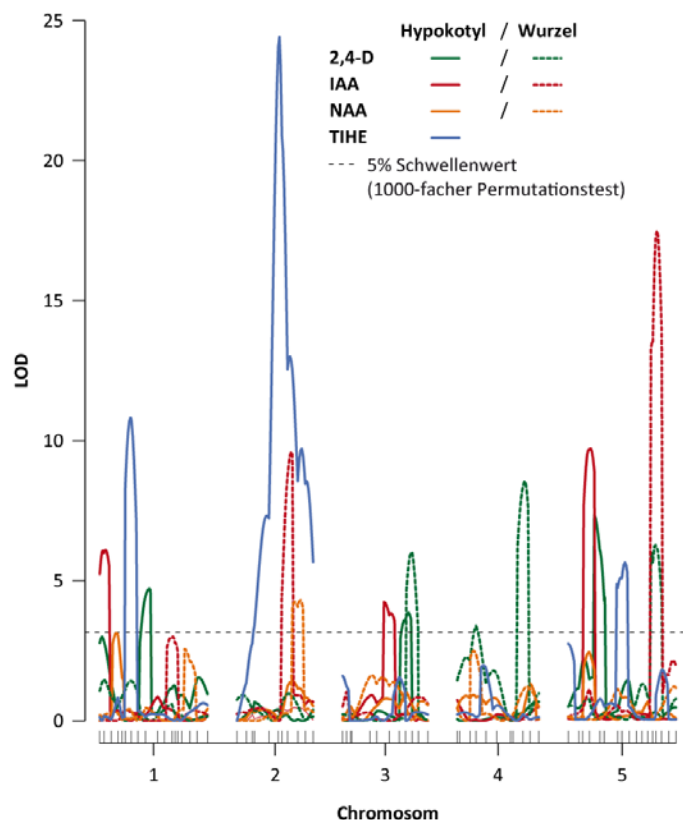
Insgesamt wurden zehn QTL-Regionen mit Hilfe der MQM-Methode identifiziert, welche für das auxinvermittelte Wurzelwachstum verantwortlich sind (Tab. 3.1, Abb. 3.9). Mittels der eindimensionalen CIM-Methode wurden allerdings nur sieben QTL-Regionen ermittelt (Abb. 3.8). Da die MQM-Methode verschiedene Kartierungsstrategien vereint (Arends *et al.*, 2010), können auch genomische Bereiche mit einem sehr geringen Einfluss auf die Merkmalsausprägung unter Umständen als statistisch signifikant identifiziert werden (Vgl. Abb. 3.8 mit Tab. 3.1 und Abb. 3.9). Daher zeigte sich, dass es sich bei der MQM-Methode, wie bereits beschrieben, um eine sehr präzise Kartierungsstrategie handelt (Arends *et al.*, 2010), die auf verschiedenen hypothetischen Modellen basiert (Arends *et al.*, 2010; Ullrich, 2013). Allerdings ist aufgrund der verschiedenen hypothetischen Modelle eine graphische Darstellung nur bedingt möglich. Deshalb wurden hierfür die Ergebnisse der CIM-Kartierung verwendet, die die einfache Darstellung in Form eines LOD-Plot ermöglicht (Abb. 3.8).

Für das 2,4-D-vermittelte Wurzelwachstum wurden die vier QTL-Regionen *W2,4-D3*, *W2,4-D4.1* sowie *W2,4-D4.2* und *W2,4-D5* als die kausalen genetischen Bereiche identifiziert. Diese lokalisieren entsprechend der Nomenklatur auf den Chromosomen 3, 4 und 5. Den stärksten QTL stellte dabei der zweite auf Chromosom 4, *W2,4-D4.2*, dar. Dieser hat einen LOD-Wert von nahezu 8,5 und einer Beteiligung an der Merkmalsausprägung von 7,5% (Tab. 3.1). Ein LOD-Wert von 8,5 bedeutet, dass die Kopplung des QTLs mit der Markerposition  $10^{8,5}$ -mal wahrscheinlicher ist, anstatt dass sie ungekoppelt vorliegen.

Die IAA-vermittelte Wachstumsinhibition der Primärwurzel wird durch drei statistisch signifikante QTL-Regionen, *WIAA1*, *WIAA2* und *WIAA5*, auf den Chromosomen 1, 2 und 5 vermittelt (MQM-Methode, Tab. 3.1). Den schwächsten QTL stellt dabei *WIAA1* mit einem LOD-Wert von 3,1 dar. Dieser konnte nur mittels der MQM-Kartierungsmethode als statistisch signifikant identifiziert werden (Vgl. Abb. 3.8 mit Tab. 3.1 und Abb. 3.9). Der auf dem unteren Abschnitt von Chromosom 5 identifizierte *WIAA5* colokalisiert partiell mit *W2,4-D5*. Hierbei handelt es sich um den QTL mit dem

höchsten LOD-Wert von 17,5 für die IAA-vermittelte Wachstumsinhibition der Primärwurzel. Außerdem trägt dieser Locus auch den stärksten Anteil zur phänotypischen Varianz von ca. 16,5% bei (Tab. 3.1).

Im Gegensatz dazu wiesen die für die NAA-vermittelten Reaktionsunterschiede identifizierten QTL-Regionen einen wesentlich geringeren LOD-Wert auf. Hierfür wurden drei QTL-Regionen auf den Chromosomen 1, 2 und 4 bestimmt und entsprechend der Nomenklatur als *WNAA1*, *WNAA2* und *WNAA4* bezeichnet (Abb. 3.8 und 3.9, Tab. 3.1). Den stärksten identifizierten QTL stellt *WNAA2* mit einem LOD-Wert von 4,5 dar. Dieser QTL ist verantwortlich für ca. 5% der phänotypischen Varianz. Des Weiteren überlappt diese Region mit *WIAA2* (Abb. 3.9). Solch eine Colokalisation könnte auf der Existenz des gleichen an der Merkmalsausprägung zu Grunde liegenden Locus beruhen. Dieser würde dann sowohl für die Reaktionsunterschiede der IAA- als auch der NAA-Behandlung verantwortlich sein. Ein ähnliches Bild zeigte sich für den QTL *WNAA1*, welcher mit *WIAA1* deckungsgleich ist (Abb. 3.9). Zusätzlich dazu ergab die QTL-Analyse die Colokalisation von *WNAA4* mit *W2,4-D4.1* und *W2,4-D4.2*. Da es sich bei *WNAA4* allerdings um eine QTL-Region mit einem sehr geringen LOD-Wert bzw. statistischer Signifikanz handelt, führte die Bestimmung des Konfidenzintervalls zu einem größeren genomischen Bereich. Daher weist in diesem Fall eine Colokalisation nicht unbedingt auf die Beteiligung gleicher Loci an der Merkmalsausprägung hin.



**Abb. 3.8: LOD-Plot der eindimensionalen QTL-Kartierung (CIM) der analysierten Auxinphänotypen für die Bay-0 x Sha RIL-Population**

Aufgetragen ist der LOD-Wert gegen die fünf Kopplungsgruppen (Chromosomen) von *A. thaliana* mit der Position der genetischen Marker. Die gestrichelte Linie entspricht dem statistischen Signifikanzniveau ( $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ; genomweiter, 1000-facher Permutationstest).

Die unterschiedlichen Behandlungen führten zur Identifizierung verschiedener QTL-Regionen. Dabei stellt *W2,4-D3* eine spezifische QTL-Region nur für den 2,4-D-vermittelten Phänotyp dar. Daneben wurden allerdings auch verschiedene kongruente Regionen identifiziert. Indes konnte kein QTL ermittelt werden, der für Reaktionsunterschiede aller drei Behandlungen verantwortlich ist. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die Signaltransduktion zwar wahrscheinlich mittels des gleichen konservierten SCF<sup>TIR1/AFB1-3</sup>-Weges erfolgt (Tan *et al.*, 2007; Calderon-Villalobos *et al.*, 2012), aber Unterschiede in der Effizienz sowie im Mechanismus des Metabolismus oder der Detoxifizierung und des Transportes für die drei untersuchten Auxine existieren (Scheel und Sandermann, 1981a; Scheel und Sandermann 1981b; Delbarre *et al.*, 1996; Pazmino *et al.*, 2012; Hosek *et al.*, 2012). Anzumerken bleibt außerdem, dass es sich hierbei häufig um sehr große genetische Intervalle handelt (Tab. 3.1), so dass die Identifizierung eines potentiellen Kandidatengens erschwert ist.

Die QTL-Analyse der auxinvermittelten Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle führte ebenfalls zur Identifizierung verschiedener QTL-Regionen. Insgesamt wurden neun kausale genomische Bereiche ermittelt (Abb. 3.8 und 3.9, Tab. 3.1). Die Namensgebung erfolgte, wie bereits beschrieben, bezüglich des analysierten Organs (H = Hypokotyl), des verwendeten Auxins und der entsprechenden Position auf den Chromosomen. Für die 2,4-D-vermittelten Reaktionsunterschiede konnten vier verschiedene QTL-Regionen identifiziert werden, *H2,4-D1.1*, *H2,4-D1.2*, *H2,4-D3* und *H2,4-D5* (Abb. 3.8 und 3.9, Tab. 3.1). Der stärkste QTL, *H2,4-D5*, wies einen LOD-Wert von ungefähr 7,5 auf und erklärt 8,6% der phänotypischen Varianz. Interessanterweise wurde eine Colokalisation von *H2,4-D3* mit *W2,4-D3* ermittelt. Demnach könnte es sich um eine Region handeln, welche eine generelle Reaktion auf 2,4-D-Applikation vermittelt.

Die Reaktionsunterschiede der IAA-vermittelten Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle führten zur Identifizierung von drei statistisch signifikanten QTL-Regionen. Diese sind auf den Chromosomen 1, 3 und 5 lokalisiert und werden entsprechend als *HIAA1*, *HIAA3* und *HIAA5* bezeichnet (Abb. 3.8 und 3.9, Tab. 3.1). Den stärksten QTL mit einem LOD-Wert von nahezu 10 stellt *HIAA5* dar. Dieser ist verantwortlich für 11% der Merkmalsvarianz. Interessanterweise ist dieser kongruent mit *H2,4-D5*. Diese Region trägt am stärksten zur 2,4-D-vermittelten Merkmalsausprägung bei (Tab. 3.1). Weiterhin colokalisiert *HIAA3* zumindest partiell mit dem QTL *H2,4-D3*. Der auf Chromosom 1 befindliche *HIAA1* weist eine Kongruenz mit anderen QTL-Regionen auf, die verantwortlich sind für Wachstumsunterschiede etiolierter Hypokotyle durch 2,4-D- (*H2,4-D1.1*) und NAA-Applikation (*HNAA1*). Allem Anschein nach könnte es sich hier um eine Region handeln, welche generell in das auxinvermittelte Hypokotylwachstum involviert ist. Neben *HNAA1* wurde noch eine zweite potentiell verantwortliche genomische Region auf Chromosom 5, *HNAA5*, identifiziert. (Abb. 3.8 und 3.9, Tab.



Dabei stellt *GIR2* mit einem LOD-Wert von nahezu 25 den stärksten in dieser Arbeit identifizierten QTL dar. Dieser weist im Gegensatz zu den anderen beiden QTL-Regionen keine Colokalisation mit weiteren QTLs auf, die verantwortlich für Reaktionsunterschiede im Hypokotylwachstum sind. Trotz des sehr definierten Konfidenzintervalls, umfasst dieser Bereich eine hohe Anzahl von mehr als 2000 verschiedenen Loci. Deren Produkte sind u. a. in der Auxinbiosynthese sowie in der Regulation des polaren Auxintransportes involviert.

Neben den individuellen Effekten der einzelnen QTL-Regionen liefern genetische Interaktionen dieser Bereiche untereinander einen wesentlichen Beitrag zur phänotypischen Variation (Carlborg und Haley, 2004; Marchini *et al.*, 2005). Hierbei kann es zu epistatischen Wechselwirkungen der parentalen Allele verschiedener QTL-Regionen kommen, was die Merkmalsausprägung in den einzelnen RI-Linien maßgeblich beeinflusst. Daher wurden die epistatischen und additiven Interaktionen der für jedes Merkmal verantwortlichen QTL-Regionen untersucht (Tab. A.5). Statistisch signifikante epistatische Interaktionen konnten nicht identifiziert werden. Im Vergleich dazu wurden diverse additive Interaktionen verschiedener QTL-Regionen für die jeweiligen Phänotypen ermittelt. Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass die individuellen Auxinphänotypen mittels eines komplexen genetischen Netzwerks reguliert werden.

Insgesamt wurden 19 genomische Regionen identifiziert, welche verantwortlich für Reaktionsunterschiede auf Auxinapplikation sind. Zusätzlich dazu wurden drei Regionen bestimmt, die eine Rolle in der Ausprägung des TIHE-Phänotyps spielen. Damit konnte gezeigt werden, dass die analysierten direkten (Applikationsexperimente) und indirekten (TIHE) Auxinantworten einer komplexen genetischen Regulation unterliegen. Aufgrund der z. T. beträchtlichen Intervallgröße (Tab. 3.1) mit einer Vielzahl an Genen, in der Regel mehr als 1000, war eine direkte Auswahl potentieller Kandidaten nicht möglich. Als Voraussetzung zur weiteren Feinkartierung der Intervalle müssen diese als statistische Wahrscheinlichkeiten angegebenen Regionen zum einen funktionell verifiziert werden. Zum anderen ist die Transformation in einen nach den Mendelschen Gesetzen monogen segregierenden Locus dieser QTL-Regionen zur weiteren Kartierung und damit zur Minimierung der Anzahl der Kandidatengene notwendig.

Die in diesem Kapitel aufgeführten Daten bezüglich der QTL-Kartierung erfolgten in Zusammenarbeit mit K. Ullrich im Rahmen seiner Dissertation (Ullrich, 2013).

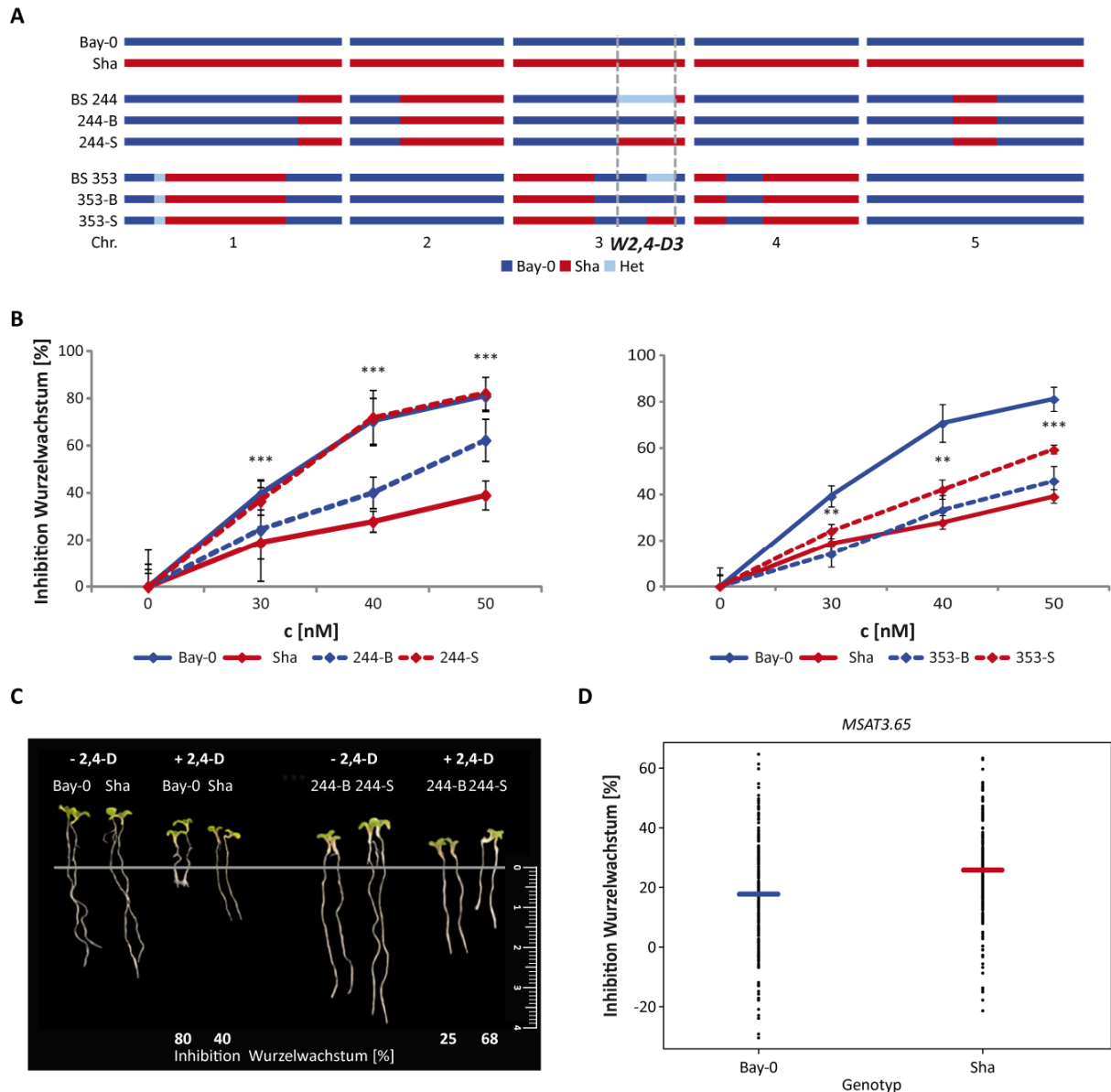
### 3.6 Funktionelle Validierung der identifizierten QTL-Regionen

Zur funktionellen Validierung von QTL-Regionen können verschiedene Ansätze genutzt werden. Eine Möglichkeit stellen die NILs dar. Diese weisen einen genomweiten homozygoten Hintergrund des einen Parentalallels auf. Lediglich innerhalb der QTL-Region befindet sich die Introgression für das jeweilige andere parentale Allel (Abb. 1.4; Koornneef *et al.*, 2004; Reymond *et al.*, 2007). Unterschiedliche Reaktionsstärken zwischen der NIL und der korrespondierenden Parentalakzession validieren die Beteiligung der QTL-Region an der Merkmalsausprägung. Alternativ können HIFs verwendet werden. Diese weisen einen identischen, allerdings heterogenen genetischen Hintergrund auf (Tuinstra *et al.*, 1997). Auch hier variieren die einzelnen Linien der HIF nur in der zu validierenden QTL-Region (Abb. 1.4). Beide Strategien können erfolgreich eingesetzt werden (Reymond *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit erfolgte die funktionelle Validierung einiger QTL-Regionen durch HIFs (Tab. 3.1). Diese wurden z. T. selbst mittels RI-Linien generiert, die idealerweise eine Restheterozygotie in der QTL-Region aufwiesen (Abb. 1.4). Durch Selbstung einer solchen RIL kommt es innerhalb dieser Region zur 1:2:1 (Bay-0-Allel:Heterozygotie:Sha-Allel) Segregation. Die Nachkommen, welche entweder homozygot für das Bay-0- oder für das Sha-Allel waren (siehe Kapitel 2.2.1.5, Tab. A.3), wurden bezüglich des zu untersuchenden Merkmals analysiert (Abb. 3.10 bis 3.16). Zeigten sich statistisch signifikante Differenzen zwischen den Linien, welche nur in der QTL-Region variieren, dann handelt es sich um die Bestätigung, dass diese Region für die unterschiedlichen Reaktionsstärken des untersuchten Phänotyps verantwortlich ist. Außerdem wird durch die funktionelle Validierung die verantwortliche QTL-Region in einen nach den Mendelschen Gesetzen monogen vererbten Locus überführt. Für eine erfolgreiche funktionelle Validierung muss allerdings der Einfluss der QTL-Region auf die Ausprägung des zu untersuchenden Merkmals ausreichend stark sein. Daher wurde die funktionelle Validierung vorrangig für QTL-Regionen durchgeführt, deren Anteil an der Merkmalsausprägung relativ hoch ist (Tab. 3.1).

#### 3.6.1 Funktionelle Validierung der QTL-Regionen *W2,4-D3* und *W2,4-D4.2*

Zunächst erfolgte die funktionelle Validierung von *W2,4-D3* (Abb. 3.10). Hierfür wurde die HIF 244 verwendet, welche von INRA (Versailles, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde. Die Linie 244-B trägt homozygot das Bay-0-Allel in der Region des *W2,4-D3*, flankiert durch die Marker *MSAT3.21* und *MSAT3.18* (Abb. 3.10A). Dementsprechend weist die Linie 244-S das Sha-Allel in diesem Intervall auf. Keimlinge beider Linien sowie der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha wurden bezüglich ihres



**Abb. 3.10: Funktionelle Validierung der QTL-Region *W2,4-D3***

(A) Die verwendeten HIFs 244 und 353 segregieren in der Region des *W2,4-D3*-Konfidenzintervalls. Zusätzlich sind die Genotypen der Parentallinien Bay-0 und Sha dargestellt. (B) Die Validierung der QTL-Region erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen nach dreitägiger Kultivierung auf mit 2,4-D angereichertem Medium. Die prozentuale Inhibition wurde, wie in Abb. 3.3 beschrieben, bestimmt ( $n \geq 12$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Die Resultate der statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.10 angegeben. Signifikanzen sind der Komplexität halber nur für die HIFs in der Abbildung dargestellt (\*\*\*) p-Wert  $\leq 0,001$ , \*\* p-Wert  $< 0,01$ ). (C) Fotos zeigen repräsentative, unbehandelte Keimlinge (- 2,4-D) sowie Pflanzen, welche auf mit 30 nM 2,4-D (244-B und -S) bzw. mit 50 nM 2,4-D (Bay-0 und Sha) angereichertem Medium angezogen wurden (+ 2,4-D). Der Größenstandard ist in cm angegeben. (D) Der Effektplot zeigt den 2,4-D-vermittelten Phänotyp einzelner RI-Linien (Punkte basieren auf Phänotypdaten der Abb. 3.7A) sowie den Mittelwert (farbige Linie) in Abhängigkeit des parentalen Genotyps an der Markerposition *MSAT3.65*.

B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; BS/Het, Heterozygotie

Die Daten zur Validierung des *W2,4-D3* wurden von S. Becker generiert (Becker, 2011).

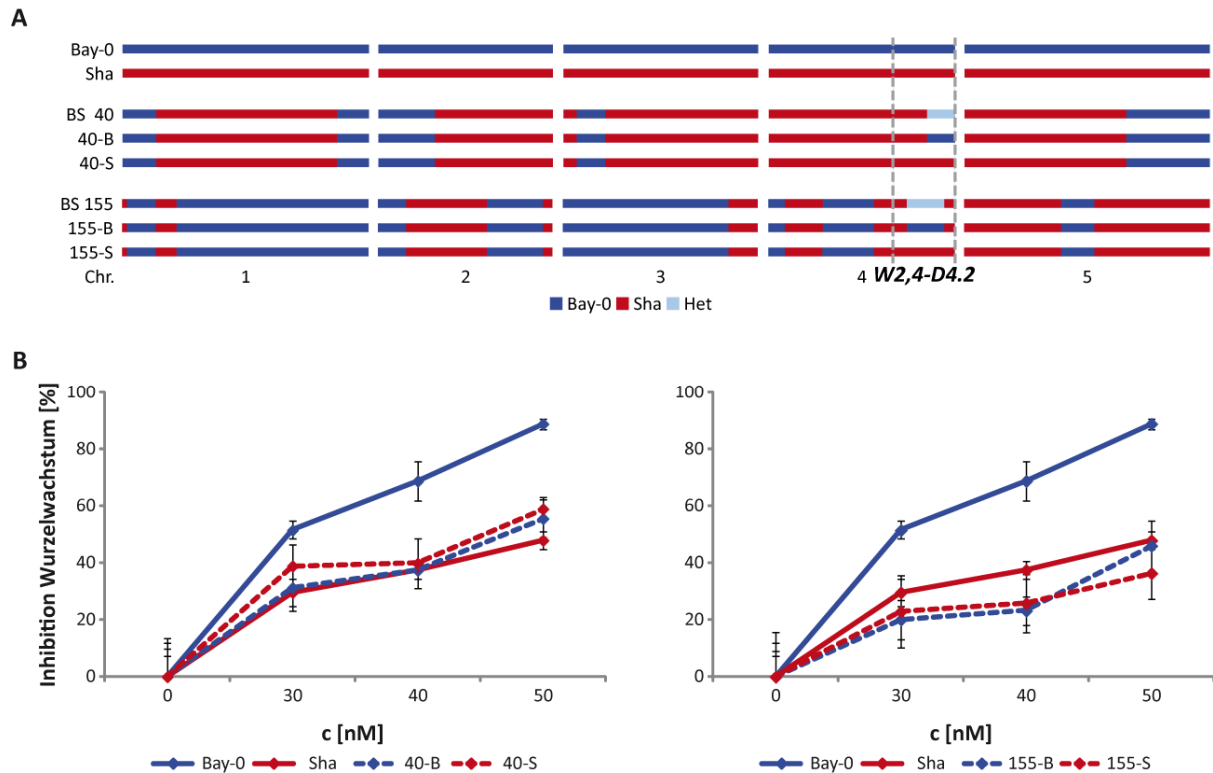


2,4-D-vermittelten Primärwurzelwachstums analysiert (Abb. 3.10B und C). Es erfolgte die Applikation höherer 2,4-D-Konzentrationen als für die Phänotypisierung der RIL-Population (Abb. 3.7A), um stärkere Unterschiede in der Antwort zu beobachten. Die Parentalakzessionen wiesen, wie bereits beschrieben, statistisch signifikante Unterschiede in der Reaktionsstärke für alle drei getesteten Konzentrationen auf (Abb. A.10). Die Linie 244-B zeigte im Vergleich zur 244-S eine signifikant geringere Inhibition des Wachstums (Abb. 3.10 und A.10).

Die im Vergleich zu den Parentalakzessionen konträre Reaktion der Linien der HIF beruht darauf, dass das Sha-Allel prinzipiell an diesem Locus die stärkere Sensitivität gegenüber 2,4-D vermittelt. Das wird aus der allelischen Verteilung des Effektplots ersichtlich (Abb. 3.10D). Diese Reaktion wird durch den spezifischen, genomischen Hintergrund der HIF 244 demaskiert. Aufgrund von Rekombinationsereignissen liegen die parental Allele neukombiniert vor und führen zur spezifischen Merkmalsausprägung des Locus. Die Demaskierung ist mit den homozygoten Parentallinien nicht ersichtlich, da die involvierten Loci einen balancierenden Einfluss auf die Merkmalsausprägung ausüben.

Ein ähnliche Reaktion wurde auch mit der unabhängigen HIF 353 beobachtet (Abb. 3.10 und A.10). Diese Daten unterstützen die Hypothese des balancierenden Effekts der parental Allele auf die Auxinreaktion. Mittels dieser Ergebnisse konnte zum einen *W2,4-D3* als eine verantwortliche Region für die Reaktionsunterschiede in der 2,4-D-vermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzel validiert werden. Zum anderen wurde mittels der funktionellen Validierung in spezifischem Pflanzenmaterial ein quantitativ vererbtes Merkmal in einen monogen segregierenden Phänotyp überführt.

Neben *W2,4-D3* sollte auch die funktionelle Validierung der QTL-Region *W2,4-D4.2* erfolgen. Geeignetes Pflanzenmaterial wurde aus den RI-Linien 40 und 155 generiert, welche in dem QTL-Intervall zumindest partiell eine Restheterozygotie aufwiesen (Abb. 3.11A). Mittels Genotypisierung der Nachkommen aus der Selbstung dieser Linien wurden homozygote Pflanzen für das Bay-0- bzw. Sha-Allel identifiziert. Diese sind als 40-B und 40-S bzw. 155-B und 155-S bezeichnet worden (siehe Kapitel 2.2.1.5; Becker, 2011). Die Reaktion der Keimlinge wurde wiederum auf drei verschiedenen 2,4-D-Konzentrationen analysiert. Bei keiner der verwendeten Konzentrationen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Reaktionsstärke zwischen den einzelnen Mitgliedern der HIFs ermittelt werden (Abb. A.10).



**Abb. 3.11: Funktionelle Validierung der QTL-Region *W2,4-D4.2***

(A) Die verwendeten HIFs 40 und 155 segregieren in der Region des *W2,4-D4.2*-Konfidenzintervalls. Zusätzlich sind die Genotypen der Parentallinien Bay-0 und Sha dargestellt. (B) Die Validierung der QTL-Region erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen nach dreitägiger Kultivierung auf mit 2,4-D-angereichertem Medium. Die prozentuale Inhibition wurde, wie bereits in Abb. 3.3 beschrieben, bestimmt ( $n \geq 12$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.10 dargestellt.

B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; BS/Het, Heterozygotie

Die HIFs zur Validierung des *W2,4-D4.2* wurden von S. Becker generiert (Becker, 2011).

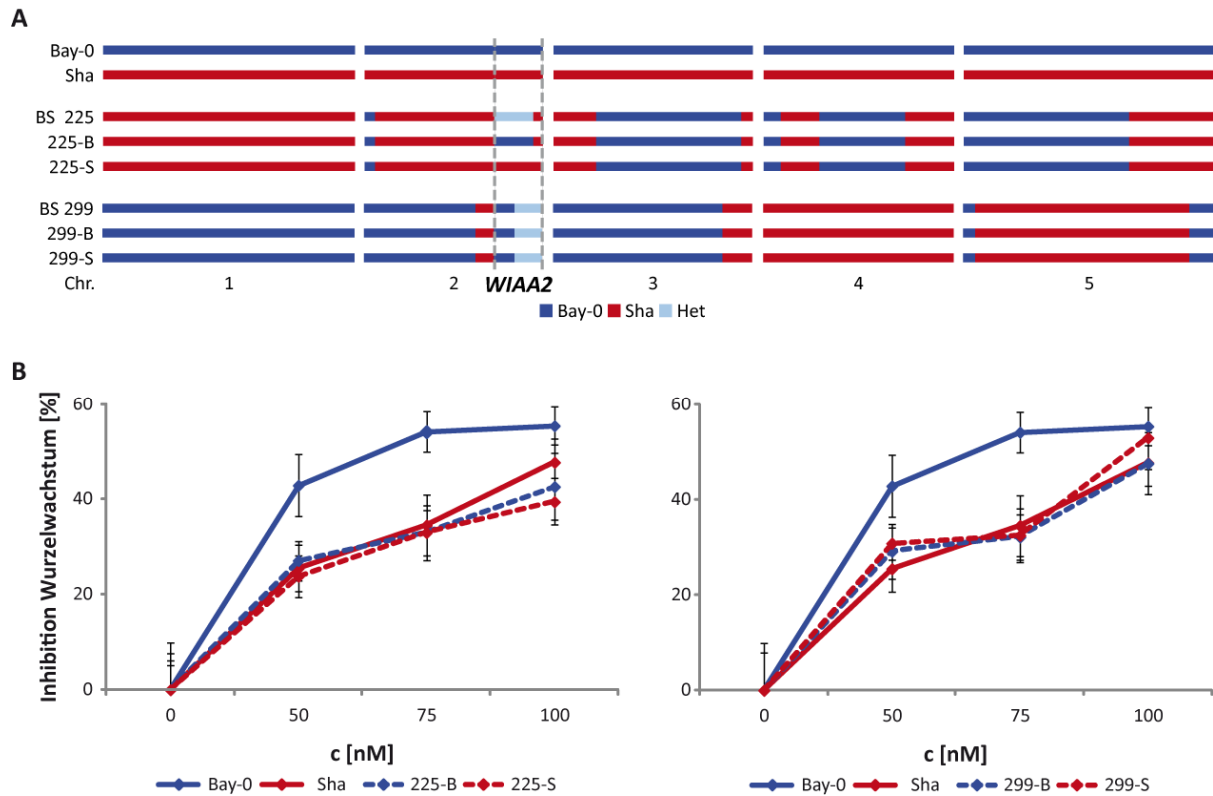
Damit wurde die QTL-Region *W2,4-D4.2* mittels dieser HIFs nicht verifiziert. Ursache hierfür könnte zum einen das Pflanzenmaterial sein. Aufgrund dessen, dass es sich um ein polygen vererbtes Merkmal handelt, kann der heterogene genomische Hintergrund der verwendeten HIFs die Ausprägung des Phänotyps überlagern. Des Weiteren könnte das verantwortliche Gen außerhalb des analysierten Intervalls lokalisieren. Obwohl der Bereich mit dem höchsten LOD-Wert (Abb. 3.8, Tab. 3.1) sich im heterogenen, analysierten Intervall der HIFs 40 und 155 befindet, bedeutet das nicht zwingend, dass auch hier das entsprechende verantwortliche Gen lokalisiert ist. Hinzu kommt, dass eine geringe Markerdichte und damit unzureichende Information über Rekombinationsereignisse in der RIL-Population zu einer Verstärkung der Kopplung zwischen QTL und Marker führen kann. Dadurch ist eine Verschiebung der LOD-Kurve möglich (Jansen, 1993; Jansen und Stam, 1994). Zum

anderen könnten QTL-Regionen identifiziert werden, welche für bestimmte Konzentrationen spezifisch sind. Jedoch wurde im Fall von *W2,4-D4.2* dieser auch bei einer Applikation von 30 nM 2,4-D als QTL identifiziert (Daten nicht gezeigt). Letztendlich ist auch die relative Abhängigkeit der Merkmalsausprägung von der Umwelt als mögliche Ursache für die nicht erfolgte Validierung in Betracht zu ziehen.

Zusätzlich zu den QTL-Regionen, *W2,4-D3* und *W2,4-D4.2*, sollte auch *W2,4-D5* funktionell validiert werden (Abb. 3.8, Tab. 3.1). Obwohl entsprechende HIFs zur Verfügung standen, konnte dieser QTL nicht weiter analysiert werden. Die Existenz des Sha-Allels in der Region *MSAT4.18* bis *MSAT4.19* auf Chromosom 4 führt zu einer epistatischen Interaktion mit *W2,4-D5* (C. Camilleri, persönliche Kommunikation). Dadurch weisen bereits unbehandelte Primärwurzeln eine drastische Reduktion des Wachstums auf, so dass der Einfluss von 2,4-D nicht weiter analysiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Sowohl für *W2,4-D4.1* als *W2,4-D5* wären zur funktionellen Validierung weitere Analysen mittels der Generierung von NILs oder anderer HIFs angebracht.

### 3.6.2 Funktionelle Validierung der QTL-Region *WIAA2*

Die funktionelle Validierung des auf Chromosom 2 lokalisierenden *WIAA2* erfolgte unter Verwendung der HIFs 225 und 299 (Abb. 3.12A). Diese wurden von INRA (Versailles, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Keimlinge beider Linien sowie die Parentalakzessionen Bay-0 und Sha wurden bezüglich ihres IAA-vermittelten Primärwurzelswachstums analysiert (Abb. 3.12B). Die Parental-akzessionen zeigten, wie bereits beschrieben, signifikante Unterschiede in der Reaktionsstärke für alle drei getesteten Konzentrationen (Abb. A.11). Bei keiner der verwendeten Konzentrationen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Reaktionsstärke zwischen den einzelnen Mitgliedern der HIFs ermittelt werden (Abb. 3.12 und A.11). Mögliche Ursachen dafür sind am Beispiel des *W2,4-D4.2* beschrieben (siehe Kapitel 3.6.1). Hinzu kommt, dass diese QTL-Region starken genetischen Wechselwirkungen unterliegt (Tab. A.5). So interagiert *WIAA2* u. a. mit *WIAA5*. Dieser QTL ist in beiden HIFs 225 bzw. 299 homozygot für das Sha-Allel (Abb. 3.13). Demnach könnte es mittels dieses Pflanzenmaterials auch zur Aufhebung des Effekts des QTLs *WIAA2* auf die phänotypische Ausprägung kommen. Um dieses Phänomen weiter zu analysieren, wären u. a. HIFs von Interesse, welche sich allelisch am *WIAA2* unterscheiden und homozygot für das Bay-0-Allel am *WIAA5*-Locus sind. Dieses Pflanzenmaterial müsste entsprechend generiert werden.



**Abb. 3.12: Funktionelle Validierung der QTL-Region *WIAA2***

(A) Die verwendeten HIFs 225 und 299 segregieren in der Region des *WIAA2*-Konfidenzintervalls. Zusätzlich sind die Genotypen der Parentallinien Bay-0 und Sha dargestellt. (B) Die Validierung der QTL-Region erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen nach fünftägiger Kultivierung auf mit IAA-angereichertem Medium. Die prozentuale Inhibition wurde, wie bereits in Abb. 3.3 beschrieben, bestimmt ( $n = 12$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.11 dargestellt.

B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; BS/Het, Heterozygotie

Die Daten zur Validierung des *WIAA2* wurden von S. Becker generiert (Becker, 2011).

### 3.6.3 Funktionelle Validierung der QTL-Regionen *H2,4-D5* und *HIAA5*

Die funktionelle Validierung der auf Chromosom 5 lokalisierenden *H2,4-D5*- und *HIAA5*-Region erfolgte unter Verwendung der HIF 130 (Abb. 3.13A). Diese wurde aus der RIL 130 generiert, welche in dem QTL-Intervall eine Restheterozygotie aufwies. Die Nachkommen aus der Selbstung dieser Linie wurden für das Bay-0- bzw. Sha-Allel als 130-B bzw. 130-S bezeichnet (siehe Kapitel 2.2.1.5). Beide Linien sowie Bay-0 und Sha wurden bezüglich der Wachstumsinhibition der etiolierten Hypokotyle durch Applikation von 375 nM 2,4-D bzw. 500 nM IAA analysiert (Abb. 3.13B und D).

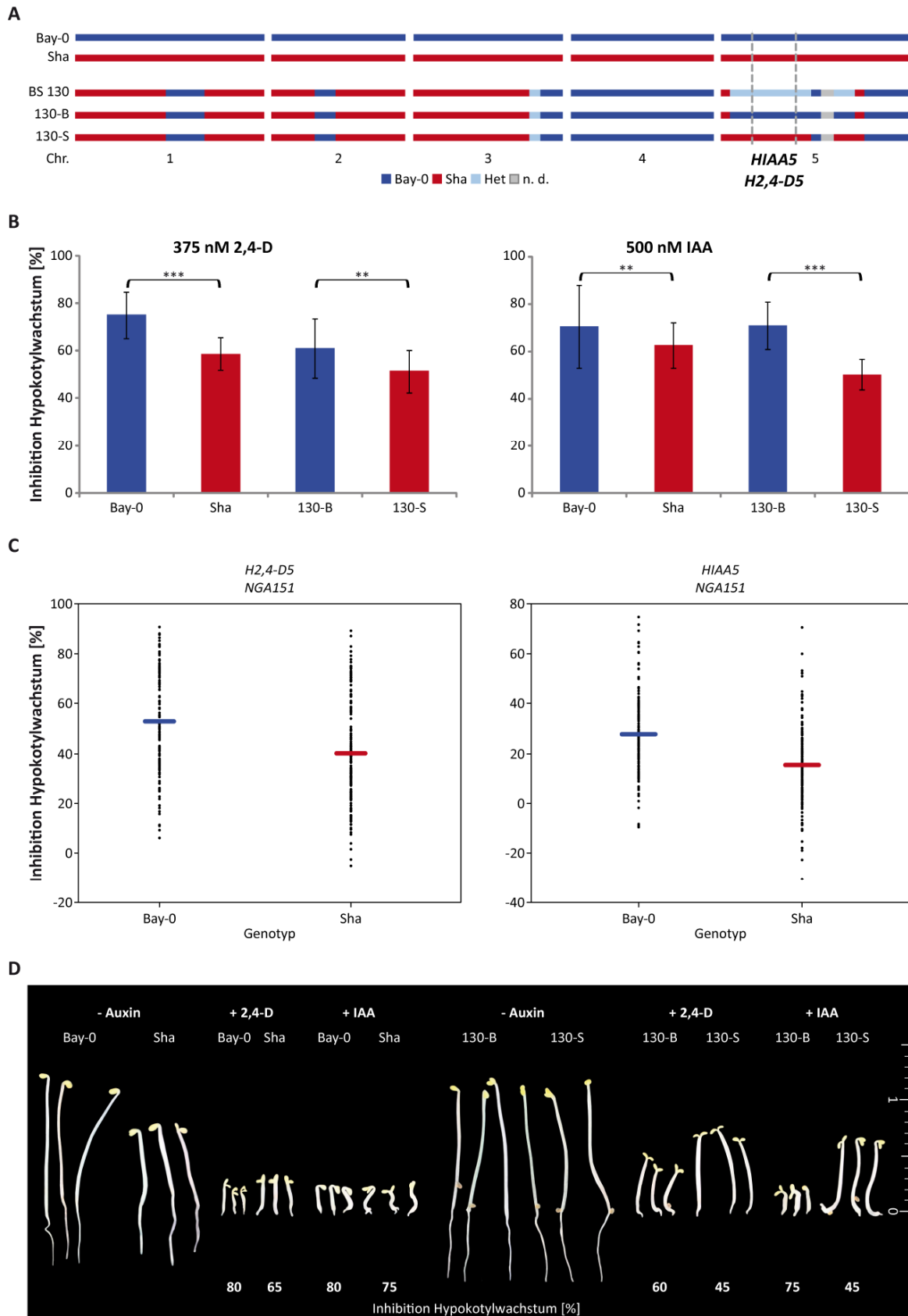


Abb. 3.13: Funktionelle Validierung der QTL-Regionen *H2,4-D5* und *HIAA5*

Fortsetzung siehe Seite 52

**Abb. 3.13: Funktionelle Validierung der QTL-Regionen *H2,4-D5* und *HIAA5* (Fortsetzung)**

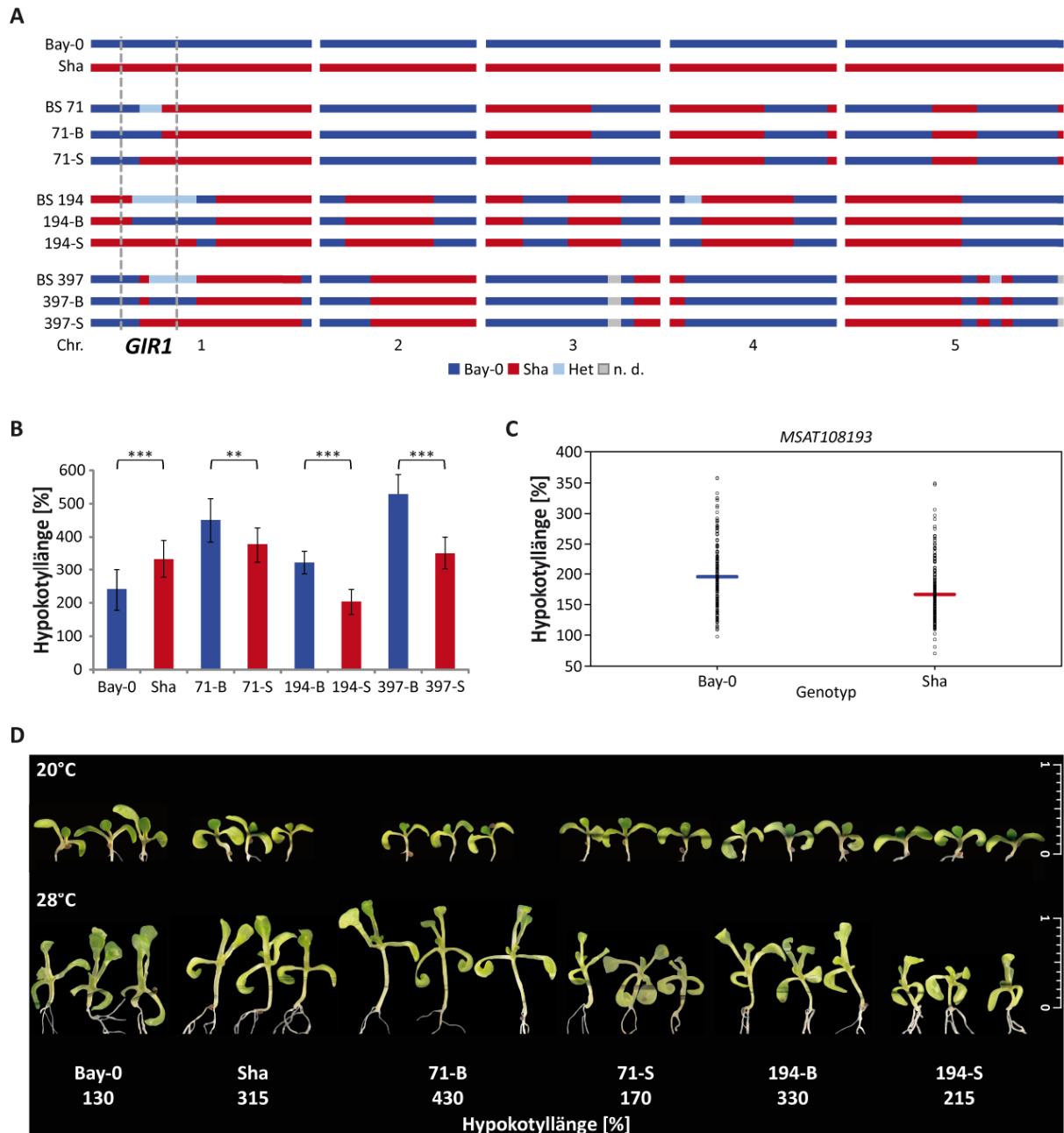
(A) Die verwendete HIF 130 segregiert in der Region des *H2,4-D5*- bzw. *HIAA5*-Konfidenzintervalls. Zusätzlich sind die Genotypen der Parentallinien Bay-0 und Sha dargestellt. (B) Die Validierung der QTL-Region erfolgte mit fünf Tage alten Keimlingen. Die prozentuale Inhibition wurde, wie bereits in Abb. 3.3 beschrieben, bestimmt ( $n = 30$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt zweimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Die Resultate der statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.12 angegeben. Signifikanzen sind der Komplexität halber nur für die HIFs in der Abbildung dargestellt (\*\* $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , \* $p$ -Wert  $< 0,01$ ). (C) Der Effektplot zeigt den 2,4-D- (links) bzw. IAA-vermittelten (rechts) Phänotyp einzelner RI-Linien (Punkte basieren auf Phänotypdaten der Abb. 3.7B) sowie den Mittelwert (farbige Linie) in Abhängigkeit des parentalen Genotyps an der Markerposition *NGA151*. (D) Fotos zeigen repräsentative, unbehandelte Keimlinge (- Auxin) sowie Pflanzen, welche auf mit 375 nM 2,4-D (+ 2,4-D) bzw. mit 500 nM IAA (+ IAA) angereichertem Medium angezogen wurden. Der Größenstandard ist in cm angegeben.

B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; BS/Het, Heterozygotie; n. d., nicht detektierbar

Die Parentalakzessionen zeigten signifikante Unterschiede in der Reaktionsstärke gegenüber der 2,4-D- bzw. IAA-Applikation (Abb. A.12). Die Linie 130-B war im Vergleich zur 130-S statistisch signifikant unterschiedlich in der 2,4-D- bzw. IAA-vermittelten Inhibition des Hypokotylwachstums (Abb. 3.13 und A.12). Die Reaktionen entsprachen auch der anhand der Effektplots zu erwartenden Richtung (Abb. 3.13C). Damit konnte die Beteiligung dieser QTL-Region an der 2,4-D- und IAA-vermittelten Reaktion bestätigt werden. Potentiell könnte derselbe Locus in der Regulation der Reaktionsstärke involviert sein, zumal ein ähnliches genetisches Interaktionsmuster vorhanden ist (Tab. A.5).

### 3.6.4 Funktionelle Validierung der QTL-Regionen *GIR1*, *GIR2* und *GIR5*

Abschließend sollten auch die QTL-Regionen *GIR1*, *GIR2* und *GIR5*, welche für die Reaktionsunterschiede des TIHE-Phänotyps verantwortlich sind, funktionell validiert werden. Im Fall der *GIR1*-Region wurden die entsprechenden HIFs aus den RI-Linien 71, 194 und 397 generiert (Abb. 3.14A). Diese Linien zeichneten sich durch zumindest eine partielle Restheterozygotie in der *GIR1*-Region aus. Daneben existierten zusätzliche heterozygote Bereiche der RIL 194 auf Chromosom 3 und bei der RIL 397 auf Chromosom 5. Aus den Nachkommen aus der Selbstung der RI-Linien wurden Linien identifiziert, welche zum einen die heterozygoten Bereiche auf Chromosom 3 (HIF 194) und 5 (HIF 397) für das Bay-0-Allel fixiert aufwiesen. Zum anderen diente es zur Identifikation von Nachkommen, die homozygot das Bay-0- bzw. Sha-Allel in der *GIR1*-Region tragen (Abb. 3.14A). Die Linienbezeichnung erfolgte analog zu Kapitel 3.6.1 als 71-B und 71-S, 194-B und 194-S bzw. 397-B und 397-S.



**Abb. 3.14: Funktionelle Validierung der QTL-Region *GIR1***

(A) Die verwendeten HIFs 71, 194 und 397 segregieren in der Region des *GIR1*-Konfidenzintervalls. Zusätzlich sind die Genotypen der Parentallinien Bay-0 und Sha dargestellt. (B) Die Validierung der QTL-Region erfolgte mit zehn Tage alten Keimlingen ( $n = 25$ ). Die Prozentangaben wurden aus den Mittelwerten der Hypokotyllänge bei 28°C im Vergleich zu 20°C bestimmt. Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.13 dargestellt (\*\*\*) p-Wert  $\leq 0,001$ , \*\* p-Wert  $< 0,01$ ). (C) Der Effektplot zeigt den TIHE-Phänotyp einzelner RI-Linien (Punkte basieren auf Phänotypdaten der Abb. 3.7C) sowie den Mittelwert (farbige Linie) in Abhängigkeit des parentalen Genotyps an der Markerposition *MSAT108193*. (D) Fotos zeigen repräsentative Keimlinge. Der Größenstandard ist in cm angegeben.

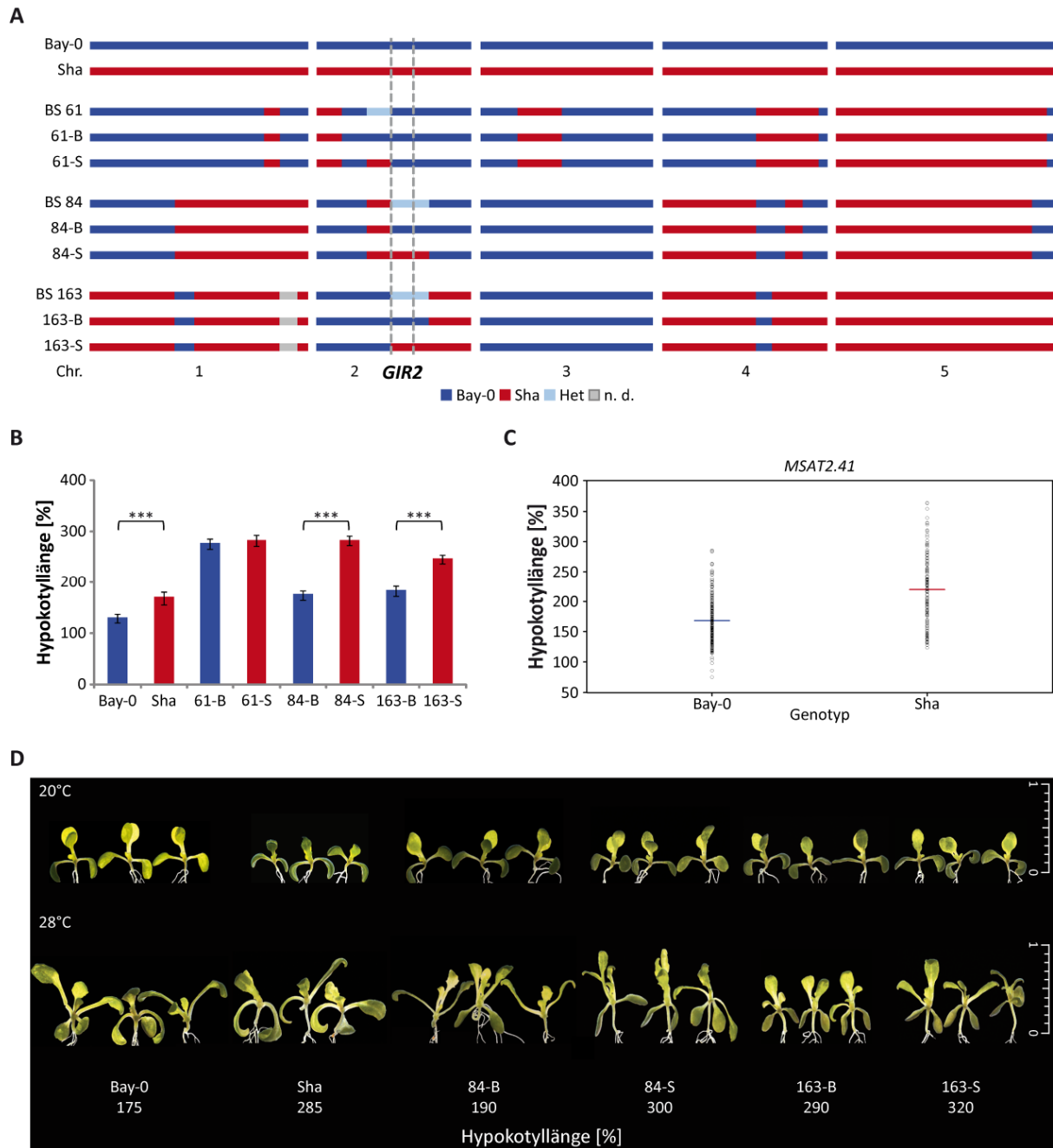
B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; BS/Het, Heterozygotie; n. d., nicht detektierbar

Die Daten zur *GIR1*-Validierung wurden von S. Becker generiert (Becker, 2011).

Die einzelnen Linien der drei HIFs wie auch die Parentalakzessionen wurden bezüglich ihrer Reaktionsunterschiede des TIHE-Phänotyps analysiert (Abb. 3.14B und D). Sowohl die Parentalakzession als auch die Linien der einzelnen HIFs untereinander zeigten statistisch signifikante Unterschiede in der Reaktionsstärke (Abb. 3.14B und A.13). Wie auch im Fall der funktionellen Validierung von *W2,4-D3* (Abb. 3.10) ist hier eine konträre Reaktion der Linien der einzelnen HIFs zu beobachten gewesen. Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass das Bay-0-Allel prinzipiell an diesem Locus die stärkere Sensitivität gegenüber erhöhten Umgebungstemperaturen vermittelt. Das wird aus den allelischen Verteilungen in den Effektplots ersichtlich (Abb. 3.14C). Die Präsenz des Bay-0-Allels in der *GIR1*-Region führt zu einer stärkeren phänotypischen Reaktion (Abb. 3.14B und D). Diese Reaktion wird aufgrund des spezifischen, genomischen Hintergrunds der verwendeten HIFs demaskiert (Vgl. auch Kapitel 3.6.1). Des Weiteren wurde für die *GIR1*-Region eine starke additive Interaktion vor allem mit dem *GIR2*-QTL identifiziert (Tab. A.5). Da allerdings diese Region heterogen in den verwendeten HIFs 71, 194 und 397 vorliegt (Vgl. Abb. 3.14A und 3.15A), kann keine Aussage zu deren Beitrag zur Demaskierung getroffen werden.

Zusätzlich zu *GIR1* sollte auch die stärkste QTL-Region *GIR2* validiert werden. Hierfür erfolgte die Verwendung der HIFs 61, 84 und 163, welche von INRA (Versailles, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurden (Abb. 3.15A). Diese wurden bezüglich ihrer Reaktionsunterschiede des TIHE-Phänotyps analysiert (Abb. 3.15B und D). Sowohl die Parentalakzession als auch die Linien der HIFs 84 und 163 zeigten untereinander statistisch signifikante Unterschiede in der Reaktionsstärke (Abb. 3.15B und A.14). Die Reaktionen entsprachen auch der anhand der Effektplots zu erwartenden Richtungen (Abb. 3.15C). Keine Reaktionsunterschiede konnten für 61-B und 61-S ermittelt werden (Abb. A.14). Dies war auch nicht zu erwarten, da sich die Linien 61-B und 61-S in einer genomischen Region außerhalb des Konfidenzintervalls von *GIR2* unterscheiden (Abb. 3.15A). Demnach diene diese HIF als interne Negativkontrolle. Mittels der Linien 84-B und 84-S bzw. 163-B und 163-S konnte *GIR2* als verantwortliche QTL-Region mit einer maximalen Größe von 7,5 Mbp validiert und in ein monogen segregierenden Locus transformiert werden.



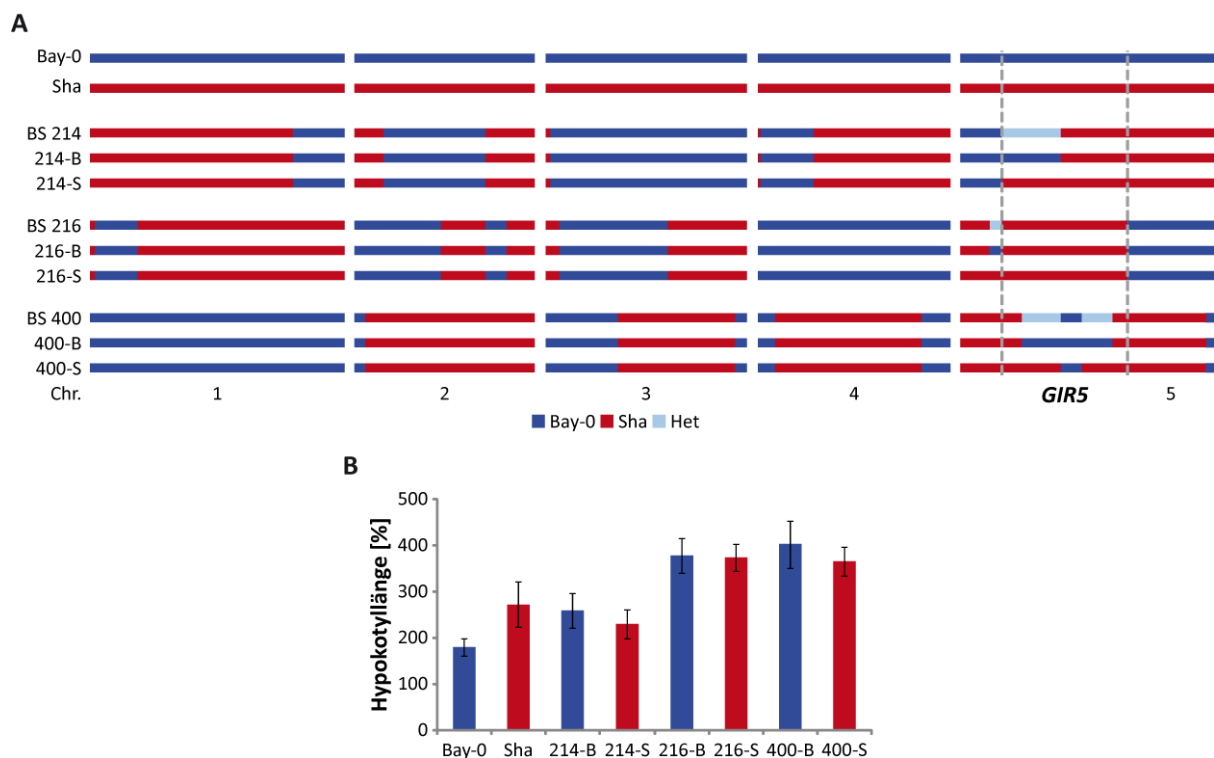


**Abb. 3.15: Funktionelle Validierung der QTL-Region *GIR2***

(A) Die verwendeten HIFs 61, 84 und 163 segregieren in der Region des *GIR2*-Konfidenzintervalls. Zusätzlich sind die Genotypen der Parentallinien Bay-0 und Sha dargestellt. (B) Die prozentuale Hypokotyllänge wurde wie in Abb. 3.14 ermittelt ( $n = 15$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.14 dargestellt (\*\*\*)  $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ). (C) Der Effektplot zeigt den TIHE-Phänotyp einzelner RI-Linien (Punkte basieren auf Phänotypdaten der Abb. 3.7C) sowie den Mittelwert (farbige Linie) in Abhängigkeit des parentalen Genotyps an der Markerposition *MSAT2.41*. (D) Fotos zeigen repräsentative Keimlinge. Der Größenstandard ist in cm angegeben.

B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; BS/Het, Heterozygotie; n. d., nicht detektierbar

Letztendlich sollte auch *GIR5* unter Verwendung der HIFs 214, 216 und 400 funktionell validiert werden (Abb. 3.16A). Wiederum wurden entsprechende RI-Linien verwendet, welche in dem QTL-Intervall eine Restheterozygotie aufwiesen (siehe Kapitel 2.2.1.5). Die Bezeichnung der Nachkommen erfolgte analog zu Kapitel 3.6.1 als 214-B und 214-S, 216-B und 216-S bzw. 400-B und 400-S (Abb. 3.16A). Sowohl die Parentalakkzessionen als auch die Linien der einzelnen HIFs wurden bezüglich ihres TIHE-Phänotyps analysiert (Abb. 3.16B). Bis auf die Parentalakkzessionen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den Linien ermittelt werden (Abb. 3.16B und A.15). Mögliche Ursachen dafür sind bereits am Beispiel des *W2,4-D4.2* (siehe Kapitel 3.6.1) beschrieben worden.



**Abb. 3.16: Funktionelle Validierung der QTL-Region *GIR5***

(A) Die verwendeten HIFs 214, 216 und 400 segregieren in der Region des *GIR5*-Konfidenzintervalls. Zusätzlich sind die Genotypen der Parentallinien dargestellt. (B) Die prozentuale Hypokotyllänge wurde wie in Abb. 3.14 ermittelt ( $n = 15$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.15 dargestellt (\*\*\*)  $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ).

B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; BS/Het, Heterozygotie

Die Daten zur *GIR5*-Validierung wurden von S. Becker generiert (Becker, 2011).

Insgesamt wurden 19 genomische Regionen identifiziert, welche verantwortlich für auxinvermittelte Reaktionsunterschiede sind (Abb. 3.8 und 3.9, Tab. 3.1). Davon erfolgte die Verifizierung des für die 2,4-D-Behandlung spezifischen *W2,4-D3* (Abb. 3.10). Innerhalb dieser QTL-Region konnten diverse auxinrelevante Komponenten identifiziert werden, die an der Signalweiterleitung oder an der Regulation des polaren Auxintransportes beteiligt sind. Außerdem wurden *H2,4-D5* und *HIAA5* validiert (Abb. 3.13). Diese Regionen colokalisieren mit *HNAA5* (Abb. 3.8 und 3.9). Daher könnte es sich hier um eine Region handeln, welche generell für das auxinvermittelte Hypokotylwachstum verantwortlich ist. Das Intervall umfasst dabei ungefähr 1800 verschiedene Gene. So enthält diese Region Gene, deren Produkte in der *de novo*-Auxinbiosynthese (z. B. YUC4) involviert sind. Außerdem wurden Komponenten identifiziert, die in der Signalkaskade (z. B. RBX1) bzw. die in der Regulation des polaren Auxintransportes (z. B. das im ER-lokalisierte Transportprotein PIN5) involviert sind. Des Weiteren könnte auch *REVEILLE 1 (RVE1)* ein potentieller Kandidatengene sein, da dessen Produkt u. a. das Hypokotylwachstum beeinflusst (Rawat *et al.*, 2009).

Daneben wurden drei Regionen bestimmt, die eine Rolle in der Ausprägung des TIHE-Phänotyps spielen. Sowohl *GIR1* als auch *GIR2* konnten mittels spezifischen Pflanzenmaterials als für den TIHE-Phänotyp kausale Regionen validiert werden (Abb. 3.14 und 3.15). Unter den ca. 2200 verschiedenen Genen im *GIR2*-Intervall war allerdings kein offensichtlicher auxinrelevanter Kandidat identifizierbar, welcher das Hypokotylwachstum bei erhöhten Anzuchtstemperaturen regulieren könnte.

Zur Reduktion der Anzahl potentieller Kandidaten schließt sich prinzipiell eine weitere Feinkartierung an. Dies ist möglich, da durch die funktionelle Verifizierung die verantwortliche QTL-Region in einen nach den Mendelschen Gesetzen monogen vererbten Locus überführt wurde. Zur Feinkartierung wird eine Kartierungspopulation benötigt. Diese kann bspw. aus der für den validierten Locus heterozygoten Linie der HIF mittels Selbstung erstellt werden. Die Nachkommen würden dann bezüglich ihres Phänotyps in die zwei zu erwartenden Klassen kategorisiert werden. Anschließend erfolgt die Genotypisierung, die zur Identifizierung der entsprechenden Rekombinanten und damit zur Verringerung der Anzahl der potentiellen Kandidaten führt. Hierfür ist allerdings ein qualitativ eindeutiger, relativ umweltunabhängiger Phänotyp notwendig. Für die meisten verifizierten QTL-Regionen (Tab. 3.1) fällt dieser Reaktionsunterschied innerhalb der analysierten HIFs zwar statistisch signifikant aus, dürfte aber dennoch zu gering sein (Abb. 3.10, 3.13 und 3.14), um eine weitere Kartierung zu erlauben. Hingegen waren die *GIR2*-vermittelten Reaktionsunterschiede für den TIHE-Phänotyp besonders deutlich zwischen den Linien 84-B und 84-S bzw. 163-B und 163-S (Abb. 3.15). Daher schien eine erfolgreiche Feinkartierung möglich, weshalb weitere Analysen den Fokus auf *GIR2* richten.

Die in diesem Kapitel aufgeführten Versuche bezüglich der Validierung der QTL-Regionen *W2,4-D3*, *WIAA2*, *GIR1* und *GIR5* erfolgten in Zusammenarbeit mit S. Becker im Rahmen seiner von mir betreuten Bachelorarbeit. Des Weiteren wurden von ihm die HIFs zur Validierung des *W2,4-D4.2* generiert (Becker, 2011).

### 3.7 Phänotypische Charakterisierungen des *GIR2*-Locus

Das Hypokotylwachstum repräsentiert einen geeigneten Phänotyp in *A. thaliana*, um den Einfluss diverser Umweltbedingungen zu analysieren. So führen Modifikationen in den Licht- und/oder Temperaturbedingungen zu veränderten Wachstumsraten (Vandenbussche *et al.*, 2005). Diese Umweltsignale werden perzipiert und resultieren in der Aktivierung eines Netzwerkes diverser regulierender Faktoren wie bspw. Phytohormone. Hierbei spielen besonders Auxin, Gibberellinsäure (*Gibberellic Acid*, GA) und Brassinosteroide eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Streckungswachstums (Nemhauser *et al.*, 2003; Frigerio *et al.*, 2006; Desgagne-Penix und Sponsel, 2008; Stavang *et al.*, 2009; O'Neill *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2011). Dabei kommt es zur gegenseitigen Interaktion des Auxin-, GA- und Brassinosteroidweges, um das Hypokotylwachstum zu kontrollieren (Gray *et al.*, 1998; Nemhauser *et al.*, 2004; Vert *et al.*, 2008; Stavang *et al.*, 2009).

Doch nicht nur Phytohormone stellen wichtige Signalmoleküle dar, sondern auch Saccharide, die damit eine Kontrollfunktion des Kohlenstoff- und Energiehaushaltes ausüben (Liu *et al.*, 2011). Die durch Saccharide bedingten Reaktionen sind stark integriert in Antworten, die durch Umweltfaktoren induziert werden (Gibson, 2005; Rook *et al.*, 2006). So reguliert Saccharose im Zusammenspiel mit GA und anderen Phytohormonen die Hypokotylelongation (Leon und Sheen, 2003; Rook *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). Generell folgt das Streckungswachstum einem diurnalen Rhythmus (Nusinow *et al.*, 2011), wobei die stärkste Wachstumsrate der Hypokotyle zum Ende der Dunkelphase erfolgt (Nozue *et al.*, 2007). Dieser Prozess wird durch Licht, Signalmoleküle und die circadiane Rhythmik reguliert (Sellaro *et al.*, 2012).

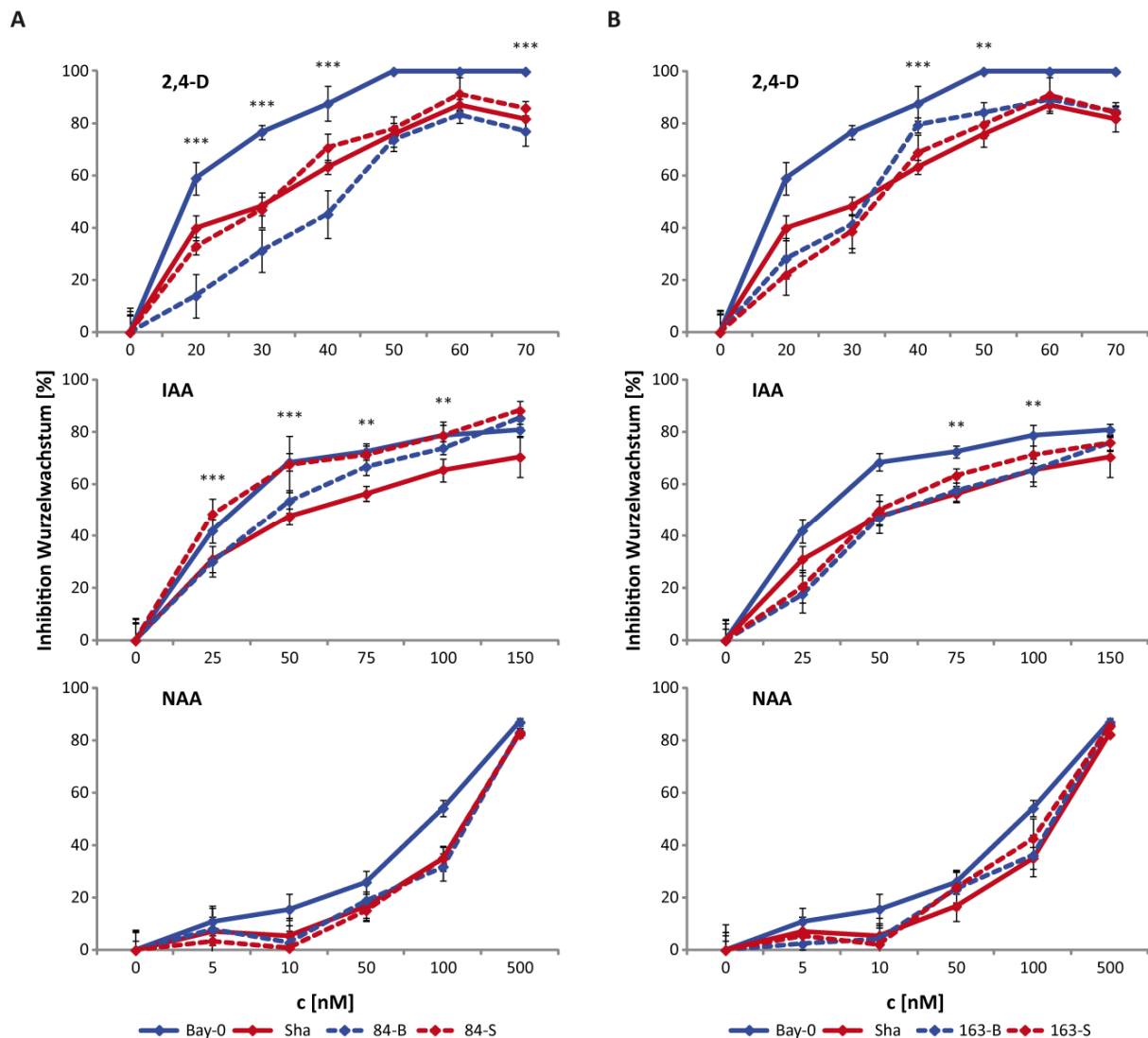
Um die Funktion des *GIR2*-Locus innerhalb dieses regulatorischen Netzwerkes zu identifizieren, sollte der Einfluss dieser Faktoren systematisch in den HIFs 84 und 163 analysiert werden. Dies war möglich, da *GIR2* in einen monogen segregierenden Locus in diesen HIFs überführt wurde (Abb. 3.15).

### 3.7.1 Analysen zum *GIR2*-abhängigen Einfluss auf physiologische Auxinreaktionen

Zunächst sollte die Funktion der *GIR2*-Region in der Auxinreaktion untersucht werden. Wie bereits beschrieben, führt die Erhöhung der Umgebungstemperatur von 20°C auf 28°C zum Anstieg der endogenen Auxinkonzentration (Gray *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 2011). Um diesen endogenen Effekt auf die Reaktion auszuschließen, wurden alle Analysen bei 20°C durchgeführt. Als erstes erfolgten detaillierte Analysen bezüglich der auxinvermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzeln in den HIFs. Neben dem natürlichen Auxin IAA wurden zusätzlich die synthetischen Auxine 2,4-D und NAA als Konzentrationsreihe appliziert (Abb. 3.17). Wie zuvor erwähnt, zeigten die Parentalakzessionen weitestgehend signifikante Unterschiede für die verwendeten Konzentrationen (Abb. A.16). Die 2,4-D-Applikation führte zwischen 84-B und 84-S zu überwiegend statistisch signifikanten Reaktionsunterschieden. Ausnahmen stellen dabei die Konzentrationen von 50 und 60 nM 2,4-D dar (Abb. 3.17A und A.16). Für 163-B und 163-S wurden signifikante Reaktionsunterschiede nur für die Konzentration von 40 und 50 nM 2,4-D ermittelt (Abb. 3.17B und A.16). Allerdings handelt es sich hierbei um sehr geringe Reaktionsunterschiede zwischen Linien der HIFs.

Ähnliche Resultate waren für die exogene Applikation des natürlichen Auxins IAA zu beobachten (Abb. 3.17). Auch hier zeigten die segregierenden Linien der HIFs 84 und 163 nur für ausgewählte Konzentrationen statistisch signifikante Unterschiede in der Wachstumsinhibition der Primärwurzel (Abb. 3.17 und A.16). Diese fielen wiederum nur sehr gering aus.

Für das zweite synthetische Auxin NAA wurden keine Unterschiede zwischen den Linien beider HIFs in der Auxinantwort ermittelt (Abb. 3.17 und A.16). Da die Konzentration von 500 nM NAA nahezu vollständig inhibierend wirkt, würde auch eine Erhöhung der Konzentration nicht zur Identifikation von Unterschieden führen. Allerdings zeigte die Inhibition des Primärwurzelwachstums einen erheblichen Anstieg zwischen 100 und 500 nM NAA. Daher ist nicht auszuschließen, dass innerhalb dieses Konzentrationsbereiches Unterschiede detektierbar wären. Da allerdings die 2,4-D und IAA-Applikationen nur zu geringfügigen Unterschieden führten, ist der Einfluss der *GIR2*-Region auf die auxinvermittelte Wachstumsinhibition nicht auszuschließen, aber wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung. Andernfalls wären drastischere Reaktionsunterschiede beider HIFs für mehrere Konzentrationen zu beobachten gewesen. Weiterhin zeigt sich aufgrund der z. T. konträren Reaktionsmuster der segregierenden Linien, dass die auxinabhängigen Effekte des *GIR2*-Locus vermutlich stark von zusätzlichen Genomregionen beeinflusst werden. Diese liegen wahrscheinlich heterogen zwischen den HIFs 84 und 163 vor.



**Abb. 3.17: Inhibition des Primärwurzelswachstums durch Auxinapplikation**

(A) Die Bestimmung der auxinvermittelten Inhibition des Primärwurzelswachstums der HIF 84 bzw. (B) HIF 163 inklusive der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen nach drei- (2,4-D- und NAA-Applikation) bzw. fünftägiger (IAA-Applikation) Kultivierung. Die prozentuale Inhibition wurde, wie bereits in Abb. 3.3 beschrieben, bestimmt ( $n = 15$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Resultate der statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.16 angegeben. Signifikanzen sind der Komplexität halber nur für die HIFs in der Abbildung dargestellt (\*\*\*)  $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ). Unabhängig generierte Linien der HIFs 84 und 163 zeigten ähnliche Resultate (Daten nicht gezeigt).

Die Daten wurden von A. Glöckner generiert (Glöckner, 2010).

Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Analysen bezüglich der auxinvermittelten Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle (Abb. A.17A und B). Auch hier wurden nur für vereinzelte Konzentrationen statistisch signifikante, jedoch minimale Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den Linien der HIFs ermittelt (Abb. A.17C). Des Weiteren führten Analysen zur Inhibition des polaren Auxintransportes durch NPA-Applikation, was spezifisch die Funktion der Auxineffluxcarrier hemmt,

zu keinen Reaktionsunterschieden (Abb. A.17A und B). Mutmaßlich beruht dies auf der starken Variation innerhalb der Linien. Daher ist auch für das Hypokotylwachstum ein direkter Einfluss der *GIR2*-Region auf Auxinreaktionen unwahrscheinlich.

Für die Ausprägung des TIHE-Phänotyps in der Col-0-Akzession ist eine Erhöhung der endogenen Auxinkonzentration und funktionellen Auxinbiologie notwendig (Gray *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 2011). Allerdings zeigen die Resultate diverser Auxinreaktionstests der Wurzel und des Hypokotyls, dass eine direkte Beteiligung von Auxin im *GIR2*-vermittelten TIHE-Phänotyp von Bay-0 und Sha unwahrscheinlich ist.

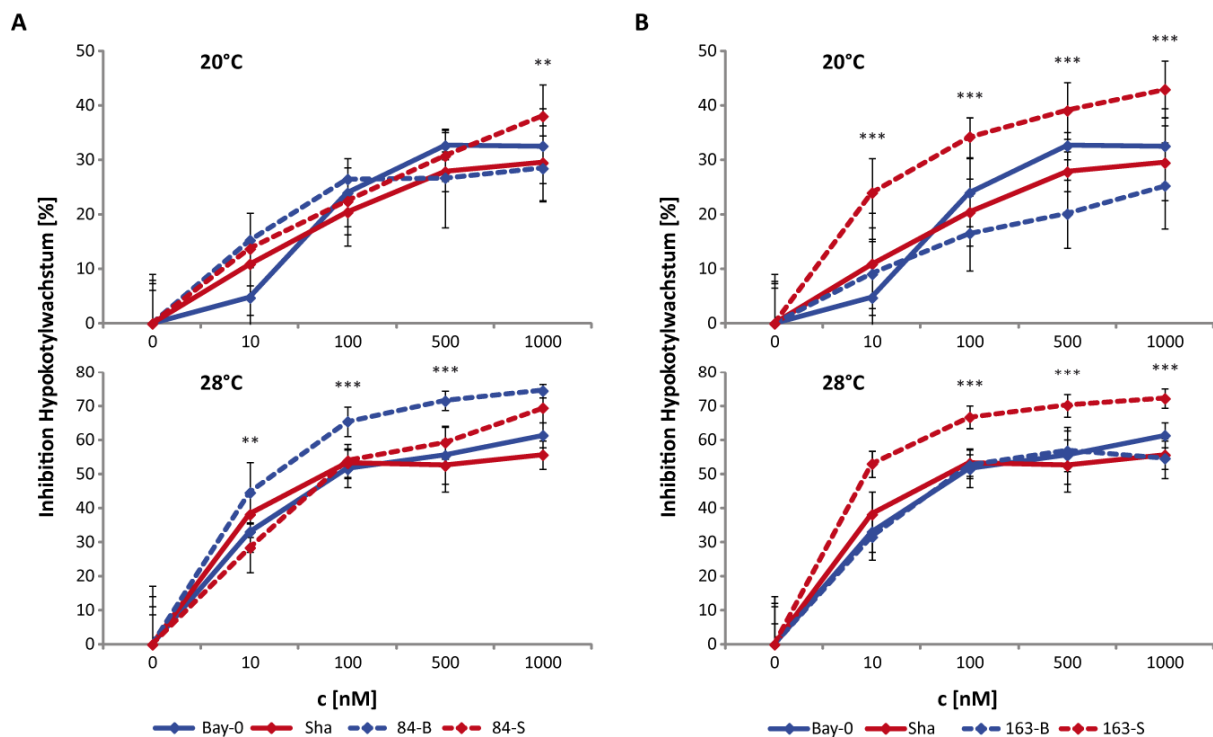
### 3.7.2 Analysen zum *GIR2*-abhängigen Einfluss auf physiologische GA-Reaktionen

Zusätzlich zu Auxin hat auch GA eine bedeutende Funktion in der Regulation des Streckungswachstums des Hypokotyls und der Sprossachse inne (Frigerio *et al.*, 2006; Desgagne-Penix und Sponsel, 2008; Stavang *et al.*, 2009; O'Neill *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2011). Daher wurde zunächst der Einfluss von exogen appliziertem GA<sub>3</sub> (der biologisch aktivste Vertreter dieser Phytohormonklasse) auf das Hypokotylwachstum der HIFs 84 und 163 sowie der Parental-akzessionen analysiert. Nur für die Konzentration von 5 µM GA<sub>3</sub> konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Parental-akzessionen ermittelt werden (Abb. A.18). Keine unterschiedlichen Reaktionen wurden für die jeweiligen Linien der HIFs ermittelt.

Um den Einfluss der *de novo*-GA-Biosynthese auf die *GIR2*-vermittelte Variation des TIHE-Phänotyps zu analysieren, wurde der Inhibitor Paclobutrazol (PAC) appliziert (Abb. 3.18). Die PAC-Applikation bei 20°C führte zu keinen Unterschieden in der Inhibition des Hypokotylwachstums für Bay-0 und Sha (Abb. A.19). Nur für die Konzentration von 1000 nM PAC sind die Linie 84-B und 84-S statistisch signifikant, aber minimal unterschiedlich in ihrer Reaktion. Konsistenter im Reaktionsmuster und signifikant unterschiedlich zeigte sich die HIF 163. Trotz linienspezifischer Varianz waren die Unterschiede deutlich (Differenz der Mittelwerte ≥ 20%). Die Linie 163-S war über alle getesteten Konzentrationen sensitiver als 163-B.

Die Erhöhung der Umgebungstemperatur von 20°C auf 28°C führte zur Steigerung der PAC-vermittelten Wachstumsinhibition, wobei die parental Linien sich phänotypisch nicht unterschieden (Abb. 3.18 und A.19). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Linien der HIFs 84 und 163 waren jedoch statistisch signifikant (Abb. 3.18 und A.19). Ausgenommen davon ist die Inhibition des Hypokotylwachstums der Linien 163-B und 163-S bei der Konzentration von 10 nM PAC bzw. 84-B und 84-S bei der Konzentration von 1000 nM PAC. Wiederum waren konträre Reaktionsmuster der

Linien der beiden HIFs zu beobachten. Linie 84-B reagierte sensibler auf die PAC-Applikation als 84-S. Im Vergleich dazu zeigte 163-S eine stärkere Inhibition des Hypokotylwachstums als 163-B. Diese Diskrepanz in der phänotypischen Reaktion der segregierenden Linien der HIFs war für verschiedene Phänotypen zu beobachten und beruht mutmaßlich auf der unterschiedlichen genetischen Komposition des jeweiligen genetischen Hintergrundes (siehe Kapitel 3.7.1). Obwohl z. T. nicht eindeutige Resultate ermittelt wurden, deuten die PAC-Applikationsanalysen an, dass für die unterschiedliche Ausprägung des TIHE-Phänotyps die GA-Biosynthese und demnach auch erhöhte GA-Konzentrationen notwendig sind. Allerdings handelt es sich hierbei, ähnlich wie für Auxin (Abb. 3.17), wahrscheinlich um sekundäre Effekte des *GIR2*-Locus, da ansonsten stärkere Reaktionsunterschiede für die Linien der beiden HIFs 84 und 163 zu beobachten gewesen wären.



**Abb. 3.18: Inhibition des TIHE-Phänotyps durch Hemmung der GA-Biosynthese**

(A) Die Bestimmung der PAC-vermittelten Inhibition des Hypokotylwachstums bei 20°C und 28°C der HIF 84 bzw. (B) HIF 163 inklusive der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha erfolgte mit sieben Tage alten Keimlingen nach viertägiger Kultivierung auf mit PAC angereichertem Medium. Die prozentuale Hypokotyllänge wurde, wie bereits in Abb. 3.3 beschrieben, bestimmt ( $n = 15$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Resultate der statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.19 angegeben. Signifikanzen sind der Komplexität halber nur für die HIFs in der Abbildung dargestellt (\*\*\*)  $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ).

Die Daten wurden von A. Glöckner generiert (Glöckner, 2011).



### 3.7.3 Analysen zum *GIR2*-abhängigen Einfluss auf die Brassinosteroidreaktion

Die Temperaturerhöhung auf 28°C resultiert in der Aktivierung des Auxinsignalweges und der späteren Induktion des Brassinosteroidweges (Stavang *et al.*, 2009). Daher wurde der Einfluss des biologisch aktivsten Brassinosteroids, dem 24-epi-Brassinolid (24-epi-BL; Clouse *et al.*, 1993), auf das Hypokotylwachstum der HIFs 84 und 163 sowie der Parentalakzessionen analysiert. Es wurden keine Unterschiede zwischen den für die *GIR2*-Region unterschiedlichen Linien der HIFs 84 und 163 ermittelt (Abb. A.20). Unter diesen experimentellen Voraussetzungen konnte eine Beteiligung des *GIR2*-Locus im Brassinosteroidweg nicht gezeigt werden.

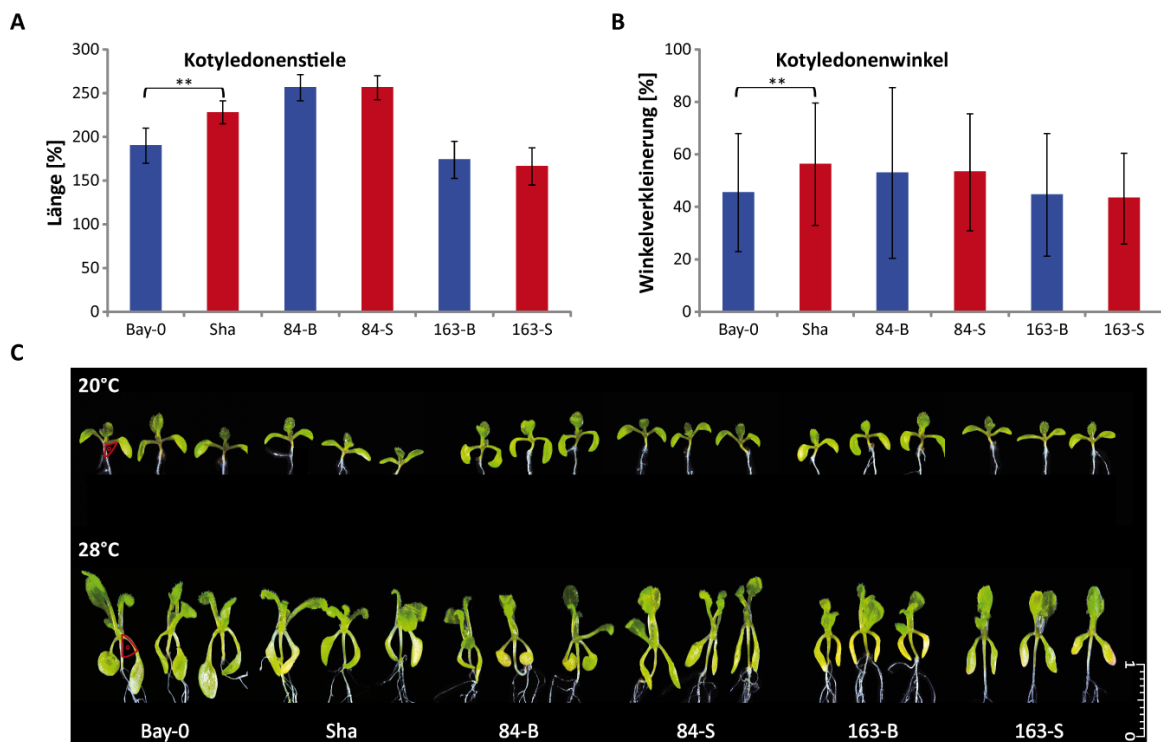
### 3.7.4 Analysen zum *GIR2*-abhängigen Einfluss auf die Saccharosereaktion

Im Zusammenspiel mit GA und anderen Phytohormonen reguliert Saccharose die Elongation von Hypokotylen (Leon und Sheen, 2003; Rook *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). Daher wurde der Einfluss der *GIR2*-Region auf das durch Saccharose induzierte Hypokotylwachstum analysiert (Abb. A.21). Die Saccharoseapplikation führte zu einem stärkeren Wachstum etiolierter Hypokotyle im Vergleich zu unbehandelten, etiolierten Keimlingen. Trotz abweichender experimenteller Ansätze wurde für die Akzession Col-0 ein ähnliches Reaktionsverhalten bereits beschrieben (Zhang *et al.*, 2010). Signifikant unterschiedliche Reaktionen wurden jedoch nicht zwischen den einzelnen segregierenden Linien der HIFs 84 und 163 ermittelt (Abb. A.21). Unter diesen experimentellen Voraussetzungen scheint auch Saccharose keine Funktion in der *GIR2*-vermittelten Reaktion zu haben.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass die für die unterschiedliche Ausprägung des TIHE-Phänotyps verantwortliche *GIR2*-Region zumindest partiell auch andere Phänotypen der Auxinantwort (Abb. 3.17) und den Einfluss der GA-Biosynthese reguliert (Abb. 3.18). Allerdings handelt es sich um sehr geringe Reaktionsunterschiede, welche z. T. nur für bestimmte Bedingungen oder einzelne HIFs ersichtlich waren. Daher kann *GIR2* zum einen kein zentraler Regulator dieser Phytohormonwege darstellen. So müssen andere Komponenten, die sich in ihrer genetischen Komposition in den HIFs 84 und 163 unterscheiden, mit in der Ausprägung dieser Phänotypen involviert sein. Zum anderen deuten die z. T. sehr geringen, allerdings statistisch signifikanten Unterschiede an, dass es sich bei den *GIR2*-vermittelten Auxin- und PAC-Reaktionen um sekundäre Phänotypen handelt. Ansonsten wären stärkere Unterschiede über mehrere Konzentrationen in den beiden HIFs zu erwarten gewesen.

3.7.5 Analysen zum *GIR2*-abhängigen Einfluss auf weitere Temperaturphänotypen

Es deutete sich bereits an, dass, in Abhängigkeit von der allelischen Ausprägung des *GIR2*-Locus, dieser weitere temperaturinduzierte Phänotypen beeinflusst (Abb. 3.15D). Hierbei handelt es sich um Phänotypen, die eine gewisse Ähnlichkeit zu der als Schattenvermeidung bekannten Reaktion (*Shade Avoidance Syndrome, SAS*) aufweisen (Halliday *et al.*, 2003; Halliday und Whitelam, 2003; van Zanten *et al.*, 2009; Foreman *et al.*, 2011; Franklin *et al.*, 2011). SAS beeinflusst maßgeblich sowohl Veränderungen der Blattstellungen als auch Verlängerung der Petiolen und Vergrößerung der Blattfläche, um die Photosyntheserate zu optimieren (Casal, 2012). Hierbei handelt es sich um Wachstumsveränderungen, welche zu ähnlichen phänotypischen Reaktionen wie bei Temperaturerhöhung führen. Obwohl diese Phänotypen primär für Laubblätter von Relevanz sind, zeigten vorangegangene Analysen auch einen Einfluss auf die Kotyledonen (Abb. 3.14D und 3.15D).



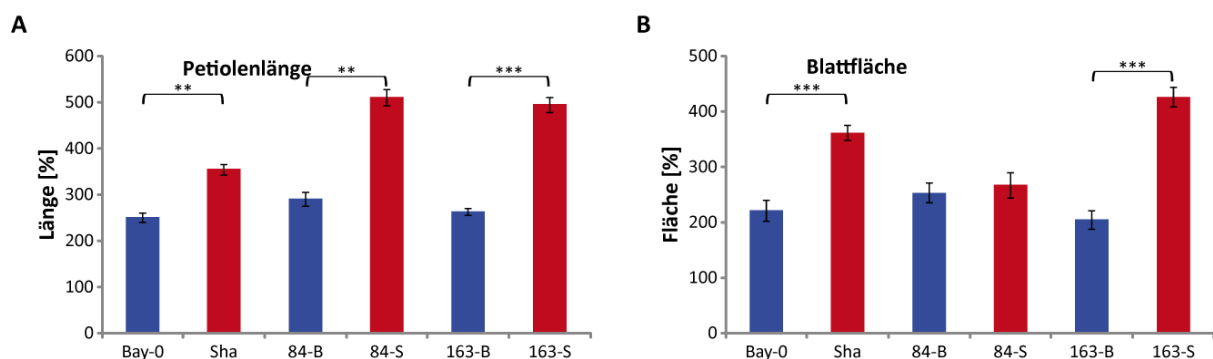
**Abb. 3.19: Temperaturinduzierte Phänotypen der Kotyledonen**

(A) Die Bestimmung der temperaturinduzierten Längen bzw. (B) Veränderungen der Winkelstellung der Kotyledonenstiele der HIFs 84 und 163 inklusive der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha erfolgte mit zehn Tage alten Keimlingen. Die prozentualen Veränderungen wurden, wie bereits in Abb. 3.3 beschrieben, bestimmt ( $n = 30$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt zweimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.22 dargestellt (\*\* $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ). (C) Fotos zeigen repräsentative Keimlinge, welche bei 20°C bzw. bei 28°C kultiviert wurden. Der Größenstandard ist in cm angegeben.

Die Daten wurden von A. Glöckner generiert (Gloeckner, 2010).

Daher wurden zunächst die einzelnen Linien der HIFs 84 und 163 sowie die Parentalakzessionen bezüglich der temperaturinduzierten Elongation der Kotyledonenstiele untersucht (Abb. 3.19A und C). Für die relative Verlängerung der Kotyledonenstiele konnte zwischen den Parentalakzessionen ein signifikanter Unterschied in der Länge ermittelt werden, nicht jedoch für die einzelnen Linien der HIFs (Abb. 3.19 und A.22). Gleiches gilt auch für die temperaturinduzierte Veränderung des Keimblattwinkels (Abb. 3.19B und C). Auch hierfür wurden nur Unterschiede zwischen Bay-0 und Sha nicht jedoch innerhalb der HIF 84 bzw. 163 ermittelt. Aufgrund der Resultate ist eine Beteiligung des *GIR2*-Locus an der Ausprägung dieser temperaturinduzierten Merkmale der Kotyledonen eher unwahrscheinlich.

Neben den Kotyledonen wurden auch die Primärblätter der HIFs 84 und 163 sowie Bay-0 und Sha bezüglich weiterer Temperaturphänotypen analysiert (Abb. 3.20). Zunächst wurde das temperaturinduzierte Petiolenwachstum untersucht (Abb. 3.20A). Eine Temperaturerhöhung von 20°C auf 28°C führte zu einem signifikant gesteigerten Streckungswachstum der Petiolen. Für die relative Verlängerung der Petiolen konnte zwischen den Parentalakzessionen sowie zwischen 84-B und 84-S bzw. 163-B und 163-S ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abb. 3.20A und A.23). Dabei führte die Präsenz des Sha-Allels zu stärkeren Reaktionen im Vergleich zum Bay-0-Allel.



**Abb. 3.20: Temperaturinduzierte Phänotypen der Primärblätter von Keimlingen**

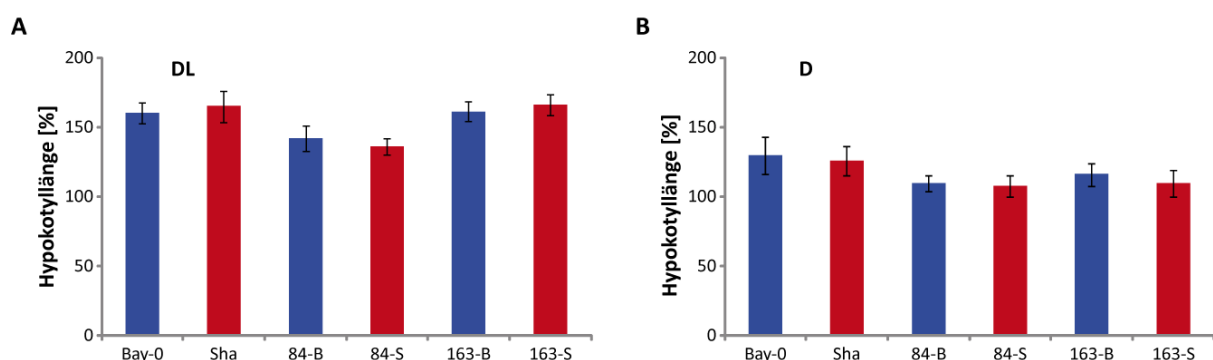
(A) Die Bestimmung der temperaturinduzierten Petiolenelongation bzw. (B) Expansion der Blattfläche von Primärblättern der HIFs 84 und 163 inklusive der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha erfolgte mit zwölf Tage alten Keimlingen. Die prozentualen Veränderungen wurden, wie bereits in Abb. 3.3 beschrieben, bestimmt ( $n = 30$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.23 dargestellt (\*\* $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ).

Die Daten wurden von A. Glöckner generiert (Gloeckner, 2010).

Weiterhin wurde die Größe der Blattfläche in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur bestimmt (Abb. 3.20B). Die relative Blattflächenausdehnung zeigte zwischen den Parentalakzessionen sowie zwischen 163-B und 163-S einen statistisch signifikanten Unterschied in der Reaktionsstärke (Abb. 3.20B und A.23). Dabei führte wiederum die Präsenz des Sha-Allels im Vergleich zum Bay-0-Allel zur stärkeren phänotypischen Ausprägung. Unterschiedliche Reaktionsstärken dieses temperaturinduzierten Phänotyps konnte allerdings nicht zwischen 84-B und 84-S ermittelt werden. Gleichwohl zeigen die Ergebnisse die Beteiligung des *GIR2*-Locus an der Ausprägung beider temperaturinduzierten Merkmale der Primärblätter zumindest für die HIF 163. Generell vermittelt das Sha-Allel das verstärkte Wachstum der Hypokotyle, der Petiolen und der Primärblätter bei erhöhten Umgebungstemperaturen (Abb. 3.15 und 3.20).

### 3.7.6 Analysen zum Einfluss des Lichts auf das *GIR2*-vermittelte Hypokotylwachstum

Zur Analyse des Lichteinflusses auf die Ausprägung des *GIR2*-vermittelten TIHE-Phänotyps wurden die HIFs 84 und 163 bzw. Bay-0 und Sha analog zur *GIR2*-Validierung (Abb. 3.15), allerdings unter Dauerlicht (DL)-Bedingungen (Abb. 3.21A) bzw. im Dunkeln (D; Abb. 3.21B), angezogen. Der Vergleich der Hypokotyllängen der Parentalakzessionen bzw. innerhalb der HIFs führte zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden in der Reaktionsstärke (Abb. A.24). Demnach benötigt der durch den *GIR2*-Locus vermittelte, unterschiedlich ausgeprägte TIHE-Phänotyp sowohl eine Licht- als auch Dunkelphase. Dies lässt eine Abhängigkeit von Komponenten der circadianen Rhythmik mutmaßen.



**Abb. 3.21: Einfluss des Lichts auf die Hypokotylelongation**

(A) Die Bestimmung der Hypokotyllängen der HIFs 84 und 163 inklusive der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha erfolgte unter DL- bzw. (B) D-Bedingungen analog zu Abb. 3.14 ( $n = 17$ ). Allerdings wurden für (B) fünf Tage alte Keimlinge verwendet. Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal (A) mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.24 dargestellt (\*\*\*) p-Wert  $\leq 0,001$ .

Zusammenfassend konnte mittels der phänotypischen Charakterisierungen des *GIR2*-Locus gezeigt werden, dass dieser in Abhängigkeit der Allelpräsenz neben dem sehr starken TIHE-Phänotyp (Abb. 3.15), auch andere phytohormonvermittelte Reaktionen reguliert (Abb. 3.17 und 3.18). Allerdings scheint die Funktion von *GIR2* im Auxin- und GA-Biosyntheseweg eher von sekundärer Bedeutung zu sein, da phänotypische Unterschiede zwar signifikant, aber z. T. nur sehr schwach und über vereinzelte Konzentrationen sowie HIFs auftraten. Außerdem ist *GIR2* verantwortlich für die Ausprägung weiterer temperaturinduzierter Phänotypen der Primärblätter (Abb. 3.20). Dabei vermittelt die Präsenz des Sha-Allels die stärkere temperaturabhängige Reaktion. Dies ist übereinstimmend mit dem TIHE-Phänotyp, wo das Sha-Allel am *GIR2*-Locus für verstärktes Hypokotylwachstum verantwortlich ist (Abb. 3.15). Die *GIR2*-Region beeinflusst die Ausprägung verschiedener temperaturabhängiger Wachstumsprozesse. Für die Ausprägung des TIHE-Phänotyps scheint ein diurnaler Rhythmus notwendig zu sein, da Unterschiede weder unter DL- noch unter D-Bedingungen bestimmt werden konnten (Abb. 3.21).

Die in diesem Kapitel aufgeführten Versuche bezüglich der Charakterisierung des *GIR2*-Locus (Abb. 3.17, 3.18, 3.19 und 3.20) erfolgten in Zusammenarbeit mit Annemarie Glöckner im Rahmen ihrer von mir betreuten Bachelorarbeit (Glöckner, 2010).

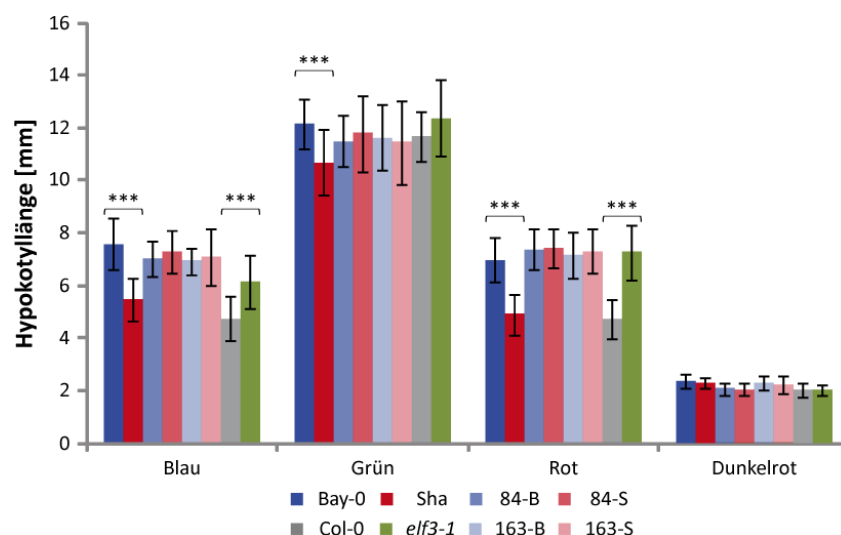
### 3.8 Identifikation eines Kandidatengens

Um detailliertere Erkenntnisse über die Funktionsweise und den Beitrag des Bay-0- bzw. Sha-Allels am *GIR2*-Locus an der Ausprägung des TIHE-Phänotyps bzw. der anderen analysierten Merkmalen zu erlangen, muss das kausale Gen identifiziert werden. Aufgrund des relativ großen Intervalls von ungefähr 7,5 Mbp war eine direkte Identifikation potentieller Kandidaten schwierig. Allerdings ergab die phänotypische Charakterisierung der *GIR2*-Region Hinweise, dass es sich hierbei um ein Gen handeln könnte, welches sowohl abhängig von als auch vermutlich in der circadianen Rhythmik involviert ist (Abb. 3.21). Hinzu kommt, dass der *GIR2*-Locus an der Ausprägung temperaturinduzierter Phänotypen beteiligt ist, welche Ähnlichkeit zu SAS-Reaktionen aufweisen (Abb. 3.15, 3.19 und 3.20).

Trotz des relativ großen Zielintervalls konnte ein solcher potentieller Kandidat ermittelt werden - *EARLY FLOWERING 3 (ELF3, At2g25930)*. Dieses Gen wurde auch in QTL-Kartierungen bezüglich der SAS-Reaktion als verantwortlicher Locus identifiziert. Hierbei führten Veränderungen des Verhältnisses von Rot- zu Dunkelrotlicht zu unterschiedlichen Ausprägungen von SAS-Phänotypen

(Jimenez-Gomez *et al.*, 2010; Coluccio *et al.*, 2011). Daher handelt es bei ELF3 um einen geeigneten Kandidaten, welcher detaillierter analysiert wurde.

ELF3 ist nicht nur an der Ausprägung von SAS-Phänotypen beteiligt, sondern vermittelt auch Reaktionen auf Behandlung mit monochromatischem Licht (Zagotta *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Kolmos *et al.*, 2011). Daher erfolgten zunächst Analysen zum Einfluss verschiedener Lichtqualitäten auf das Hypokotylwachstum. Hierfür wurden die für den *GIR2*-Locus unterschiedlichen Linien der HIFs 84 und 163 sowie Bay-0 und Sha verwendet. Außerdem sind die *loss-of-function*-Mutante *elf3-1* (Hicks *et al.*, 1996) und der entsprechende Wildtyp der Col-0-Akzession analysiert worden (Abb. 3.22). Die *elf3-1*-Mutante war im Vergleich zur Referenzakzession Col-0 sensitiver im Hypokotylwachstum gegenüber Blau- und Rotlicht. Keine Unterschiede wurden für grünes und dunkelrotes Licht ermittelt (Zagotta *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Kolmos *et al.*, 2011). Für die parental Akzessionen konnten phänotypische Reaktionsunterschiede im Hypokotylwachstum für Blau-, Grün- und Rotlicht beobachtet werden. Interessanterweise vermittelt das Bay-0-Allel im Vergleich zum Sha-Allel das stärkere Hypokotylwachstum für alle drei genannten Farbspektren des Lichts. Ein ähnliches Phänomen war bereits für den SAS-Phänotyp des Hypokotyls bekannt. Hierbei führt ein Impuls mit Dunkelrotlicht zum Ende der Tagphase, welches Beschattung simulieren soll, zum gesteigertem Hypokotylwachstum in Bay-0 im Vergleich zu Sha (Coluccio *et al.*, 2011). Im Vergleich dazu wird die Ausprägung des längeren Hypokotylphänotyps durch das Sha- anstatt des Bay-0-Allels am *GIR2*-Locus vermittelt (Abb. 3.15C).



**Abb. 3.22: *GIR2*-unabhängige Hypokotylelongation in Abhängigkeit von der Lichtqualität**

Die Bestimmung der absoluten Hypokotyllängen der HIFs 84 und 163, der Parental-akzessionen Bay-0 und Sha bzw. der *elf3-1*-Mutante sowie des entsprechenden Wildtyps Col-0 erfolgte mit vier Tage alten Keimlingen unter DL verschiedener Wellenlängen (Blau-, Grün-, Rot- und Dunkelrotlicht). Die Hypokotyllängen repräsentieren Mittelwerte ( $n \geq 20$ ).

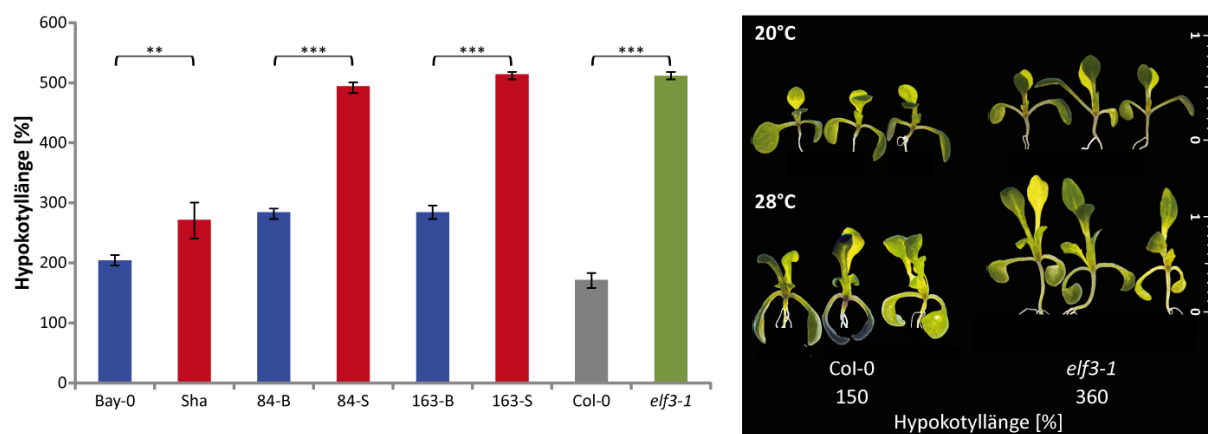
Die Fehlerbalken stellen die absolute Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (\*\*\*) p-Wert  $\leq 0,001$ ; Abb. A.25).

Die Daten wurden in Kooperation mit M. Ni (University of Minnesota, St. Paul, USA) generiert.

Das führt zu der Annahme, dass der durch das Sha-Allel des *GIR2*-Locus vermittelte TIHE-Phänotyp nicht in die Regulation des Hypokotylwachstums bei veränderten Lichtbedingungen involviert ist. Dies wird bestätigt, da keine der Linien der HIFs 84 und 163 einen signifikanten unterschiedlichen Phänotyp aufwies (Abb. 3.22). Demnach kann eine Beteiligung des *GIR2*-Locus an dem durch veränderte Lichtqualitäten vermittelten Hypokotylwachstum unter diesen experimentellen Voraussetzungen ausgeschlossen werden.

Um einen potentiellen Einfluss von *ELF3* auf die Ausprägung des TIHE-Phänotyps zu analysieren, wurde dieser in der *elf3-1*-Mutante und der entsprechenden Referenzakzession Col-0 untersucht. Die phänotypische Reaktion der *elf3-1*-Mutante war statistisch signifikant stärker im Vergleich zu der Referenzakzession Col-0 (Abb. 3.23 und A.26). Da *elf3-1* wie auch das Sha-Allel am *GIR2*-Locus den TIHE-Phänotyp vermittelt, weist das auf eine Beteiligung von *ELF3* an der Merkmalsausprägung hin.

Die Ergebnisse der Abb. 3.22 und 3.23 zeigen für *elf3-1* eine duale Funktion beim durch Lichtqualität vermittelten als auch temperaturinduzierten Hypokotylwachstum. Für *GIR2* konnte nur eine Beteiligung an der Ausprägung des TIHE-Phänotyps gezeigt werden. Wenn mittels Komplementationsanalyse *ELF3* als Kandidat verifiziert werden kann, muss die Funktionsweise der *elf3-1 loss-of-function*-Mutante anders erfolgen als die des *ELF3*-Bay-0- bzw. -Sha-Allels. Zunächst sollte allerdings mittels Feinkartierung das entsprechende Zielintervall von *GIR2* mit 7,5 Mbp weiter eingegrenzt werden, um die Anzahl der Gene zu verringern.



**Abb. 3.23: TIHE-Phänotyp der *elf3-1*-Mutante**

Die Bestimmung des TIHE-Phänotyps der HIFs 84 und 163, der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha bzw. der *elf3-1*-Mutante sowie des entsprechenden Wildtyps Col-0 erfolgte analog zu Abb. 3.14 ( $n = 15$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt dreimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.26 dargestellt (\*\* $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , \*\*  $p$ -Wert  $< 0,01$ ). Fotos zeigen repräsentative Keimlinge. Der Größenstandard ist in cm angegeben.

Die Analysen zur Abhängigkeit des Hypokotylwachstums von der Lichtqualität (Abb. 3.23) erfolgten in Kooperation mit M. Ni (University of Minnesota, St. Paul, USA).

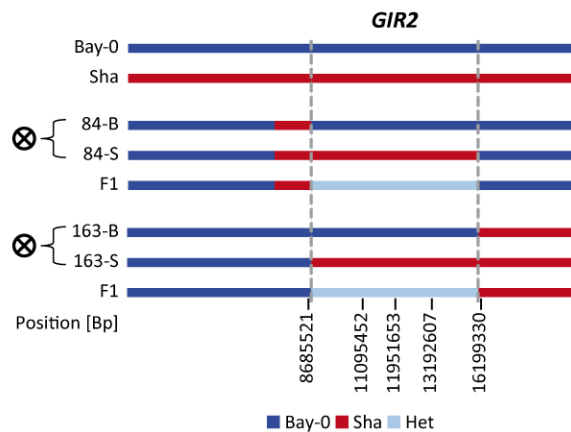
### 3.9 Feinkartierung des *GIR2*-Locus

Eine weitere Feinkartierung des *GIR2*-Locus ist möglich, da dieser durch die funktionelle Verifizierung der an der Ausprägung des TIHE-Phänotyps beteiligte QTL in einen nach den Mendelschen Gesetzen monogen vererbten Locus überführt wurde (Abb. 3.15). Zur Feinkartierung wird eine Kartierungspopulation benötigt. Um eine entsprechende F1-Generation zu erzeugen, wurden die Linien 84-B und 84-S bzw. 163-B und 163-S untereinander gekreuzt. Mittels Genotypisierung erfolgte die Identifikation heterozygoter F1-Pflanzen (Abb. 3.24, Daten nicht gezeigt). Die aus den unabhängigen Kreuzungen der Linien 84-S (♂) x 84-B (♀) und 163-S (♂) x 163-B (♀) hervorgegangenen F1-Pflanzen wurden bezüglich ihres TIHE-Phänotyps analysiert. Als Kontrollen wurden sowohl die Akzessionen Bay-0 und Sha als auch die parentalen Linien der Kreuzung analysiert. Diese waren durchgehend signifikant unterschiedlich in der Reaktionsstärke (Abb. 3.24B und A.27). Die analysierten F1-Generationen aus der Kreuzung 84-S x 84-B sowie 163-S x 163-B zeigten eine starke Ausprägung des TIHE-Phänotyps, welcher ähnlich zum paternalen Phänotyp ist (84-S bzw. 163-S). Demnach handelt es sich um einen klassischen dominant-rezessiven Erbgang. Dabei ist das Bay-0-Allel, welches die geringere Hypokotyllänge vermittelt, rezessiv. Das Sha-Allel, welches verstärktes Hypokotylwachstum bei erhöhten Umgebungstemperaturen induziert, liegt dominant vor.

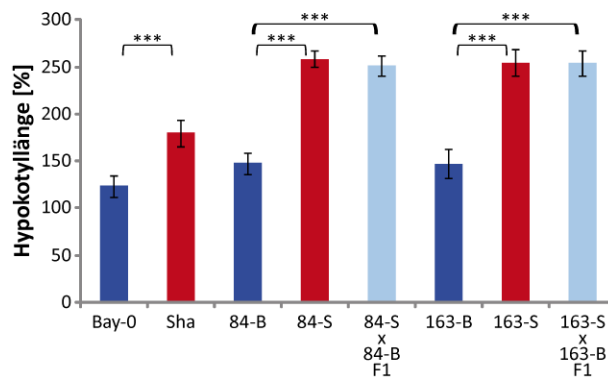
Anschließend erfolgte die Selbstung dieser F1-Generation, um eine F2-Kartierungspopulation zu generieren. Aufgrund von Rekombinationsereignissen innerhalb der heterozygoten Region kam es nur am *GIR2*-Locus zur Neukombination der parentalen Allele (Abb. 3.25). Da der restliche genomische Hintergrund der HIFs identisch ist, kann es hier durch Rekombinationsereignisse zu keiner Neukombination von Allelen kommen. Die F2-Pflanzen wurden dann bezüglich ihres Phänotyps in die zwei Klassen kategorisiert: lange oder kurze Hypokotyle. Aufgrund der monogen, dominant-rezessiven Vererbung des TIHE-Phänotyps (Abb. 3.24B) sollte ein Viertel aller Pflanzen ein kurzes Hypokotyl aufweisen. Diese F2-Pflanzen weisen dementsprechend homozygot das Bay-0-Allel in der verantwortlichen Region auf. Die Kartierung mittels des rezessiv vererbten Locus ist prinzipiell wesentlich informativer, da von vornherein heterozygote Pflanzen aufgrund des Phänotyps ausgeschlossen werden können.



A



B

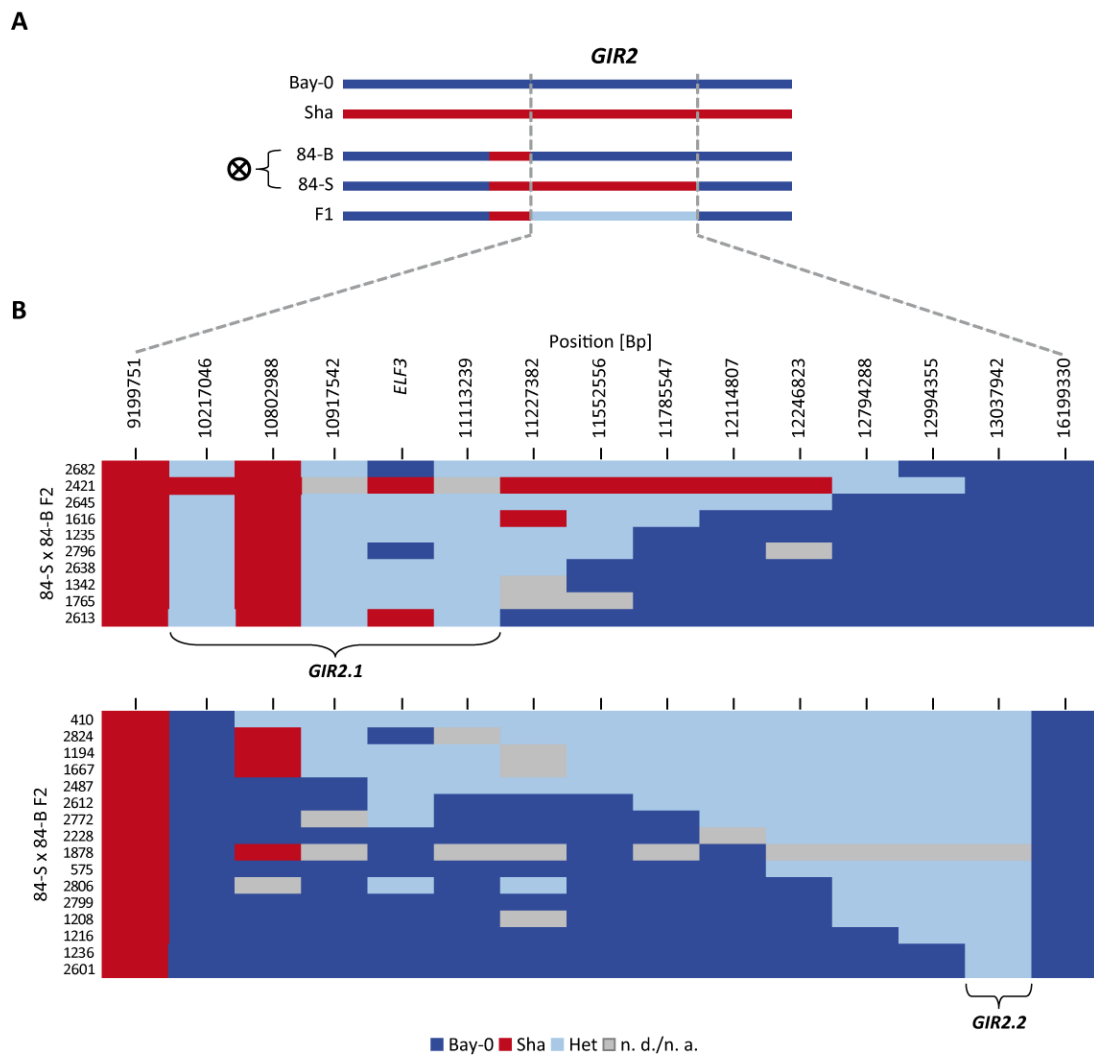


**Abb. 3.24: Erstellung einer Kartierungspopulation für die Feinkartierung des *GIR2*-Locus**

(A) Die Genotypen des Chromosoms 2 mit der *GIR2*-Region sind für die Parentalakzessionen Bay-0 und Sha sowie für die HIFs 84 und 163 bzw. der aus der Kreuzung dieser Linien generierten F1-Generation schematisch dargestellt. Die physikalische Position der Mikrosatelliten-Marker, die zu Beginn der Arbeit zur Verfügung standen, ist in Bp angegeben (Loudet *et al.*, 2002). (B) Die Bestimmung des TIHE-Phänotyps erfolgte analog zu Abb. 3.14 ( $n \geq 10$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt mit je drei unabhängigen F1-Generationen mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.27 dargestellt (\*\*\*)  $p$ -Wert  $\leq 0,001$ .

B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; Het, Heterozygotie

Insgesamt wurden nahezu 6000 F2-Pflanzen bezüglich ihres TIHE-Phänotyps analysiert. Von diesen wurden jeweils ungefähr 1000 dem kurzen bzw. dem langen Phänotyp zugeordnet. Da die Zuordnung der Phänotypen unter äußerst stringenten Bedingungen erfolgte, um den Anteil der als falsch-positiv identifizierter Pflanzen zu minimieren, entspricht dies keiner Mendelschen Segregation von 3:1. Zunächst wurden F2-Pflanzen des kurzen, rezessiv vererbten Hypokotylphänotyps analysiert. Die anschließende Analyse der aus der F2-Generation hervorgegangenen F3-Pflanzen ergab, dass diese sowohl einen langen als auch kurzen Hypokotylphänotyp aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der rezessiven Vererbung des Bay-0-Allels handelt es sich um unerwartete Ergebnisse in der F3-Generation, wo eine konsequente Ausprägung des kurzen Hypokotyls zu erwarten gewesen wäre. Daher war eine eindeutige Kategorisierung des kurzen Hypokotylphänotyps und weitere Feinkartierung mit diesem Pflanzenmaterial nicht möglich.



**Abb. 3.25: Feinkartierung des *GIR2*-Locus**

(A) Die Genotypen des Chromosoms 2 mit der *GIR2*-Region sind für die Parentalaccessionen Bay-0 und Sha sowie für die HIF 84 bzw. der 84-S x 84-B F1-Generation schematisch dargestellt. (B) Die rekombinanten F2-Pflanzen aus der Kreuzung 84-S x 84-B sind nach der Präsenz des Bay-0-Allels sortiert, welches nicht an der Ausprägung des langen TIHE-Phänotyps beteiligt ist. Analyse der Rekombinanten führte zur Identifizierung von zwei verantwortlichen Loci innerhalb des *GIR2*-Konfidenzintervalls, die als *GIR2.1* und *GIR2.2* bezeichnet wurden. Die Genotypisierung erfolgte in der Regel mittels CAPS-Markern, wobei die physikalische Position der SNPs nach TAIR10.0 (<http://arabidopsis.org/>) angegeben ist. Die Allele am *ELF3*-Locus wurden mit dem entsprechenden SSLP-Marker bestimmt.

B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; Het, Heterozygotie; n. d., nicht detektierbar; n. a., nicht analysiert

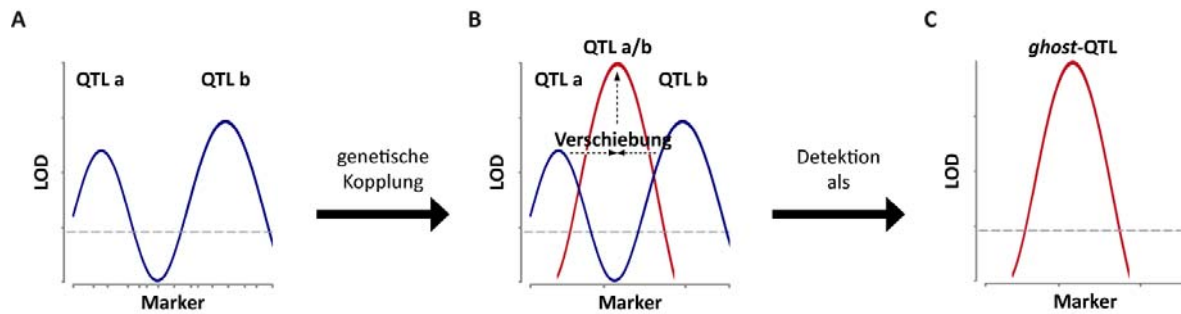
Für die weitergehende Kartierung wurden F2-Pflanzen verwendet, welche den durch das Sha-Allel dominant vermittelten langen Hypokotylphänotyp bei 28°C aufwiesen. Zunächst wurden 300 Individuen genotypisiert und entsprechende rekombinante Pflanzen identifiziert (Abb. 3.25). In diesem Fall erfolgte die Kartierung bezüglich eines dominant vererbten Allels. Daher führte die Existenz des homo- und heterozygot vorliegenden Sha-Allels zur Ausprägung des langen

Hypokotylphänotyps. Dementsprechend wurde nach dem Ausschlussprinzip kartiert. Regionen, die homozygot das Bay-0-Allel vorliegen haben, sind nicht an der Ausprägung des langen Hypokotylphänotyps bei 28°C beteiligt (Abb. 3.25).

Die Genotypisierung führte zur Identifizierung von 26 F<sub>2</sub>-Linien, welche für bestimmte Bereiche innerhalb des *GIR2*-Locus homozygot das Bay-0-Allel tragen (Abb. 3.25). Zum einen wurden zehn rekombinante Linien identifiziert, bei denen das rechte Intervall des *GIR2*-Locus aufgrund der Existenz des homozygoten Bay-0-Allels ausschließbar ist. Zum anderen führte die Genotypisierung zur Identifikation von 16 rekombinanten F<sub>2</sub>-Pflanzen, bei denen das linke *GIR2*-Intervall nicht in der stärkeren Hypokotylverlängerung involviert sein kann. Diese zunächst widersprüchlichen Kartierungsdaten deuten an, dass zwei Loci an der Merkmalsausprägung beteiligt sein müssen.

Dieses Phänomen ist in der QTL-Kartierung bekannt, bleibt aber weitgehend unberücksichtigt. Vereinfacht dargestellt, geht die QTL-Kartierung von der Existenz eines verantwortlichen Gens pro QTL aus (Abb. 3.26A). Wenn es allerdings zu einer genetisch engen Kopplung von mindestens zwei QTL-Regionen bzw. Genen kommt, dann beeinflusst dies die auf statistischer Analyse beruhende Kartierung (Abb. 3.26B). Das führt zu einer künstlichen Verschiebung der beiden gekoppelten QTL-Regionen. Im Extremfall bedeutet dies, sofern diese Regionen statistisch nicht mehr voneinander trennbar sind, dass sie zu einem großen QTL, einem sogenannten *ghost*-QTL, verschmelzen. Lagemäßig wird dann der höchste LOD-Wert in der Mitte der beiden QTL-Positionen bestimmt (Abb. 3.26C). Zu separieren sind diese Regionen nur, wenn sich zwischen ihnen ein QTL-freies Intervall befindet, für das entsprechende Marker und natürlich Rekombinanten vorhanden sein müssen (Wright und Kong, 1997; Seillier-Moiseiwitsch, 1999).

Unter der Berücksichtigung der Existenz solcher *ghost*-QTLs kann es durchaus möglich sein, dass sich zwei (oder potentiell mehrere) verantwortliche Gene in einer als ein QTL identifizierten Region befinden. Demnach ist es durchaus plausibel, wie die genotypischen Daten nahelegen (Abb. 3.25), dass mehr als ein Kandidatengen von einem QTL repräsentiert wird. Daher wurde die *GIR2*-Region in die Loci *GIR2.1* und *GIR2.2* umbenannt (Abb. 3.25B).

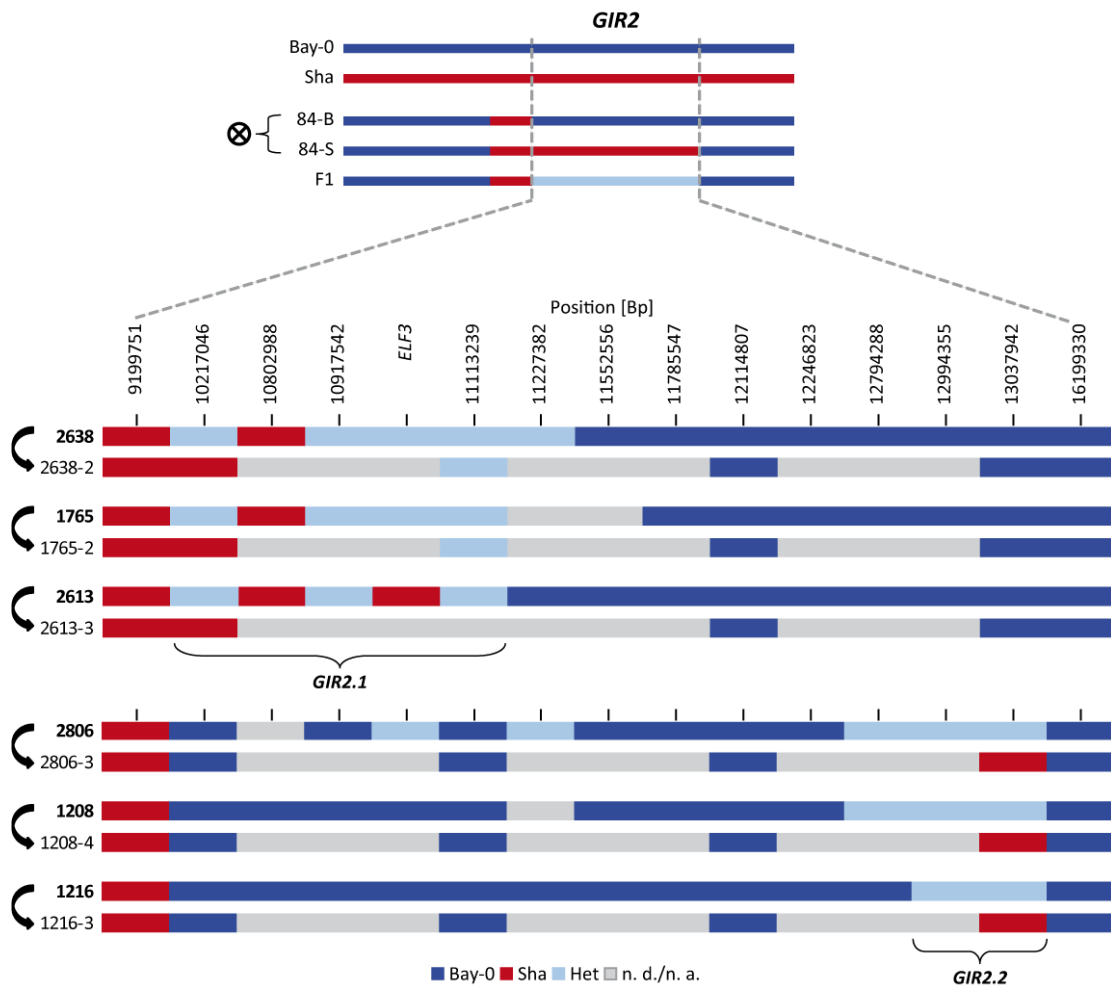


**Abb. 3.26: Schematische Darstellung zur Entstehung von *ghost*-QTLs**

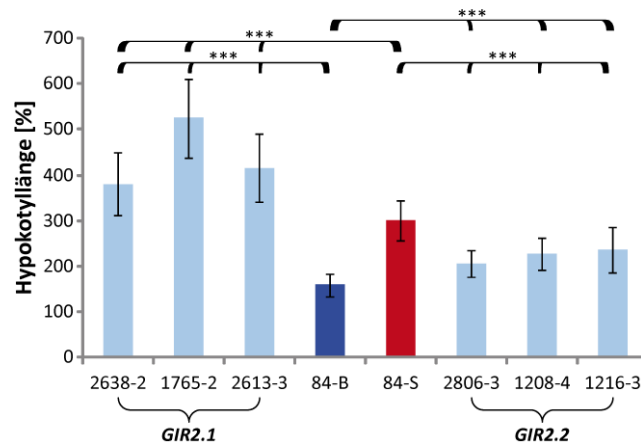
(A) Zwei genetisch ungekoppelte QTL-Regionen können mittels QTL-Kartierung identifiziert werden. (B) Wenn es zu einer genetisch engen Kopplung von mindestens zwei QTL-Regionen/Genen (QTL a und QTL b) kommt, was bspw. auf einer geringeren Markerdichte und/oder unzureichenden Rekombinationsereignissen beruht, dann beeinflusst dies die auf statistischer Analyse beruhende QTL-Kartierung. Es führt zu einer künstlichen Verschiebung der beiden gekoppelten QTL-Regionen. Im Extremfall, wenn diese Regionen statistisch nicht mehr voneinander trennbar sind, verschmelzen sie zu einem großen QTL, einem sogenannten *ghost*-QTL (QTL a/b). (C) Lagemäßig wird dann der höchste LOD-Wert in der Mitte der beiden QTL-Positionen detektiert (Wright und Kong, 1997; Seillier-Moiseiwitsch, 1999). Solche *ghost*-QTLs können durch Verschmelzen von zwei (oder mehr) gekoppelten QTL-Regionen entstehen, welche den gleichen Einfluss auf das zu untersuchende Merkmal haben. Entgegengesetzt agierende QTL-Regionen würden zur Auslöschung führen und wären damit nicht detektierbar.

Zum eindeutigen phänotypischen Nachweis, dass beide Regionen an der Merkmalsausprägung involviert sind, müssen *GIR2.1* und *GIR2.2* genetisch getrennt vorliegen. Dafür sollten detaillierte Analysen der aus den Rekombinanten hervorgegangenen Generationen erfolgen. Es wurden F<sub>2</sub>-Pflanzen genutzt, welche bereits ein verringertes Zielintervall des *GIR2.1*- und *GIR2.2*-Locus aufwiesen (Abb. 3.27A). Diese sind geselbstet und deren Nachkommen genotypisiert worden. In der F<sub>3</sub>-Generation konnten Individuen identifiziert werden, welche homozygot für das Sha-Allel in der *GIR2.1*- bzw. der *GIR2.2*-Region sind. Die jeweilige andere Region wies homozygot das Bay-0-Allel auf. Hierbei handelt es sich um die Linien 2638-2, 1765-2 und 2613-3 für den *GIR2.1*-Locus (Abb. 3.27). Für die *GIR2.2*-Region konnten die Linien 2806-3, 1208-4 und 1216-3 ermittelt werden. Diese Linien wurden wiederum in die nächste Generation überführt und bezüglich ihres TIHE-Phänotyps analysiert. Die Linien, welche homozygot das Sha-Allel nur am *GIR2.1*-Locus tragen, zeigten im Vergleich zu der parentalen Linie 84-B statistisch signifikante Unterschiede in der Reaktionsstärke (Abb. 3.27B und A.28). Interessanterweise war ihr Hypokotylwachstum im Vergleich zur parentalen Linie 84-S außerdem wesentlich stärker. Auch die Linien, die homozygot das Sha-Allel nur am *GIR2.2*-Locus tragen, zeigten im Vergleich zu den parentalen Linien signifikante Unterschiede im Hypokotylwachstum (Abb. 3.27B und A.28). Allerdings verhielt sich die Reaktionsstärke intermediär zu 84-B und 84-S.

A



B



**Abb. 3.27: Phänotypische Trennung des *GIR2*-Locus in *GIR2.1* und *GIR2.2***

(A) Die Genotypen des Chromosoms 2 mit der *GIR2*-Region sind für die Parentalakzessionen Bay-0 und Sha sowie für die HIF 84 bzw. der 84-S x 84-B F1-Generation schematisch dargestellt. Weiterhin sind die Genotypen von rekombinanten F2- (fett markiert) und F3-Pflanzen aus der Kreuzung 84-S x 84-B gezeigt. In der F3-Generation wurden Linien selektiert, die homozygot das Sha-Allel in der *GIR2.1*- bzw. *GIR2.2*-Region tragen. Fortsetzung siehe Seite 76

**Abb. 3.27: Phänotypische Trennung des *GIR2*-Locus in *GIR2.1* und *GIR2.2* (Fortsetzung)**

(B) Die Bestimmung des TIHE-Phänotyps erfolgte analog zu Abb. 3.14 für die Parentallinien der Kartierungspopulation 84-B und 84-S sowie der Keimlingen der aus den selektierten F3-Linien hervorgegangenen F4-Generation. Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar ( $n \geq 15$ ). Die Analyse wurde in der F5-Generation bestätigt (Daten nicht gezeigt). Angaben zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA sind in Abb. A.28 dargestellt (\*\*\*) p-Wert  $\leq 0,001$ .

B/Bay-0, homozygot Bay-0-Allel; S/Sha, homozygot Sha-Allel; Het, Heterozygotie; n. d., nicht detektierbar; n. a., nicht analysiert

Mittels dieser Phänotypisierung wurde gezeigt, dass beide Regionen die Ausprägung des TIHE-Phänotyps beeinflussen, da sie zu signifikant stärkeren Reaktionen als die parentale Linie 84-B führten. Die zwei Loci, *GIR2.1* und *GIR2.2*, konnten mit den verwendeten Rekombinationstypen genetisch getrennt werden. Allerdings wird auch deutlich, dass beide Loci einen unterschiedlich starken Effekt auf die Ausprägung des Merkmals ausüben. So führte die genetische Isolation des *GIR2.1*-Locus zu einem signifikant stärkeren TIHE-Phänotyp im Vergleich zur parentalen Linie 84-S. Obwohl dieses Szenario ungewöhnlich erscheint, ist annehmbar, dass in der parentalen Linie 84-S, bei der beide Loci homozygot für das Sha-Allel vorliegen, der Effekt des *GIR2.1* durch die Existenz des *GIR2.2* gemindert wird. Anhand dieser eindeutigen Isolation der beiden an der Merkmalsausprägung involvierten Loci, ist ihr jeweiliger Anteil an der Merkmalsausprägung klar ersichtlich. Genetische Interaktionen beider Loci deuten sich im Hinblick auf die Stärke der Merkmalsausprägung der zu Grunde liegenden Parentalakzessionen an (Abb. 3.27B).

Um allerdings den genauen Mechanismus der Interaktion zwischen den Loci analysieren und verstehen zu können, ist die Kenntnis potentieller Kandidaten notwendig. So umfasst das *GIR2.1*-Intervall mit einer Größe von ungefähren 2 Mbp 550 verschiedene Gene und *GIR2.2* bei einer Größe von 3,4 Mbp mehr als 1000 potentielle Kandidatengene (Abb. 3.25). Daher muss das Zielintervall weiter eingegrenzt werden. Dafür kann die aus der Kreuzung 84-S x 84-B hervorgegangene F3-Generation genutzt werden (Abb. 3.27). Es konnten nicht nur Linien identifiziert werden, welche homozygot das Sha-Allel am *GIR2.1*- und *GIR2.2*-Locus tragen, sondern auch für den jeweiligen Locus heterozygote Pflanzen. Nach Selbstung dieser Pflanzen kann die F4-Generation als Kartierungspopulation sowohl für die *GIR2.1*- als auch für die *GIR2.2*-Region dienen. Anzumerken bleibt, dass für den *GIR2.1*-Locus rekombinante Linien identifiziert wurden, welche *ELF3* weiterhin als potentiellen Kandidaten einschließen (Abb. 3.25B und 3.27). Unterstützt wird dieser Kandidat durch den verstärkten TIHE-Phänotyp der *loss-of-function*-Mutante *elf3-1* (Abb. 3.23).

Die Feinkartierung des *GIR2*-Locus mit der Identifizierung spezifischer Rekombinanten ergab, dass mindestens zwei Loci bzw. Gene am *GIR2*-vermittelten TIHE-Phänotyp beteiligt sein müssen (Abb.

3.25 und 3.27). Beide Regionen, *GIR2.1* und *GIR2.2*, vermitteln jeweils die stärkere Ausprägung des Hypokotylwachstums bei erhöhten Umgebungstemperaturen, allerdings mit unterschiedlichem Beitrag. Durch die eindeutige genetische Trennung von *GIR2.1* und *GIR2.2* konnte in der vorliegenden Arbeit die Existenz der aus der Theorie bekannten *ghost*-QTLs für *GIR2* belegt werden. Aufgrund der signifikanten und deutlichen Reaktionsunterschiede des TIHE-Phänotyps der F3-Generation für zumindest *GIR2.1* im Vergleich zu den Parentallinien ist eine weitere Feinkartierung möglich, um das Zielintervall zu verringern. Ein aussichtsreiches Kandidatengen für diesen Locus ist *ELF3*, da auch die *loss-of-function*-Mutante *elf3-1* ein verstärktes Hypokotylwachstum bei erhöhten Umgebungstemperaturen aufweist (Abb. 3.23).

## 4 Diskussion

In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurde für diverse Pflanzenspezies, u. a. auch für den Modellorganismus *A. thaliana*, gezeigt dass eine Vielzahl von Merkmalen einer natürlichen genetischen Variation unterliegt. Dabei standen bisher vorrangig Phänotypen mit konkretem Adaptationsbezug im Fokus, wie z. B. Blühzeitpunkt, Samenkeimung oder Resistenz gegenüber abiotischen und biotischen Stressfaktoren (Koorneef *et al.*, 2004; Alonso-Blanco *et al.*, 2009; Weigel, 2012). Nur ansatzweise wurde die pflanzliche Entwicklung in Reaktion auf Signalmoleküle, wie bspw. die Phytohormone Salizylsäure und Jasmonat nach Pathogenbefall, analysiert (Kliebenstein *et al.*, 2006; van Leeuwen *et al.*, 2007; Todesco *et al.*, 2010). Insbesondere für universelle Signalmoleküle wie Auxin sind detaillierte Analysen bezüglich der natürlichen Variation bisher nicht erfolgt. Bei diesem Phytohormon handelt es sich um ein essentielles Primärmetabolit, welches elementare Prozesse der Zellteilung, des -wachstums und der -differenzierung reguliert (Chapman und Estelle, 2009). Daher beeinflusst Auxin so gut wie alle Prozesse des pflanzlichen Lebenszyklus und vermittelt die Reaktion auf diverse umweltbedingte wie auch entwicklungsphysiologische Stimuli. Zur Gewährleistung der korrekten Integration diverser Reize unterliegt die Auxinhomöostase unterschiedlichen Regulationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen: Auxinbiosynthese und Metabolismus, polarer Auxintransport sowie Signalperzeption und -weiterleitung mit darauf folgenden transkriptionellen und morphologischen Veränderungen. Hierbei handelt es sich vermutlich um komplexe regulatorische Netzwerke, weshalb adaptionsrelevante, genetische Determinanten nicht einfach mit auf Mutagenese basierenden Ansätzen zu bestimmen sind. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit genetisch diverse *A. thaliana*-Akzessionen als Ressource genutzt, um natürlich existierende Allele von neuen oder bereits bekannten Komponenten der Auxinbiologie zu identifizieren.

### 4.1 Natürliche genetische Variation physiologischer Auxinphänotypen

Da die Auxinreaktion vermutlich mittels eines komplexen genetischen Netzwerks reguliert wird (Delker *et al.*, 2010), wurde ein quantitativ genetischer Ansatz genutzt. Dafür muss zunächst (i) die Frage nach der Existenz der natürlichen genetischen Variation in *A. thaliana* geklärt werden. Anschließend erfolgen (ii) Analysen bezüglich der Vererbungsmodalität dieser genetisch bedingten, phänotypischen Unterschiede. (iii) Zur Kartierung der für die phänotypischen Unterschiede kausalen Genomregionen wird eine segregierende Kartierungspopulation benötigt. Im Fall von quantitativ vererbten Merkmalen in Pflanzen werden vorzugsweise RIL-Populationen verwendet. Mit diesen erfolgt mittels QTL-Analysen die Grobkartierung der für die phänotypischen Unterschiede kausalen



genomischen Regionen. (iv) Die so identifizierten QTL-Regionen müssen zur weiteren Feinkartierung zunächst funktionell verifiziert werden. Dies führt u. a. zur Transformation der zwar als QTL identifizierten Region in einen monogen segregierenden Locus. Die Verifizierung erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit HIFs. Zu beobachtende Merkmalsunterschiede können in diesen Pflanzenlinien exakt auf die segregierende Region zurückgeführt werden, da sich diese nur in diesem Bereich unterscheiden (Tuinstra *et al.*, 1997). Die Validierung einer QTL-Region und die Überführung in einen monogen segregierenden Locus sind die Grundvoraussetzung für (v) die weitere Feinkartierung der zum Teil enorm großen genomischen Regionen, um das entsprechende Kandidatengen zu identifizieren. (vi) Die Verifizierung des verantwortlichen Kandidatengens erfolgt mittels Komplementationsanalyse und bestätigt die genetische Grundlage der QTL-Region (Yano, 2001; Salvi und Tuberosa, 2005). (vii) Aufgrund der öffentlichen Verfügbarkeit von genomischen Sequenzdaten verschiedener Akzessionen (Clark *et al.*, 2007; Zeller *et al.*, 2008) kann die QTL-Region auch auf die verantwortlichen InDels bzw. den einzelnen SNP zurückgeführt werden. Diese allelischen Polymorphismen sind von enormer Relevanz, um die Funktionsweise und die Regulation bzw. Interaktion des verantwortlichen Gens im Zusammenhang mit der untersuchten natürlichen Variation des Phänotyps besser zu verstehen (Maloof, 2003; Tonsor *et al.*, 2005).

Um zunächst die Frage nach der Existenz von natürlich genetischer Variation bezüglich verschiedener Auxinphänotypen zu klären, wurde eine Kollektion geographisch unterschiedlicher *A. thaliana*-Akzessionen gewählt, welche eine maximale genetische Diversität aufweisen (Nordborg *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007). Für diverse auxinvermittelte Phänotypen des Wurzel- sowie des Hypokotylwachstums konnte die natürliche Variation in dieser kleinen Kollektion gezeigt werden (Abb. 3.1 und 3.3).

Sich anschließende Segregationsanalysen diverser, spaltender F<sub>2</sub>-Generationen ergaben, dass die Vererbung dieser phänotypischen Unterschiede nicht einem monogenen Mendelschen Erbgang unterliegt (Abb. 3.4 und 3.5). Die Ergebnisse legen eine zumindest oligogene Vererbung nahe, womit es sich bei den analysierten Auxinphänotypen um quantitativ vererbte Merkmale handelt. Daher scheint die Auxinbiologie in *A. thaliana* sehr komplex reguliert zu sein. Da auf Signalwegesebene gezeigt wurde, dass zumindest der gleiche Grundbauplan der involvierten Gene in verschiedenen Akzessionen vorhanden ist (Delker *et al.*, 2010), scheinen andere Aspekte der Auxinbiologie einer unterschiedlich starken Regulation zu unterliegen.

Um die entsprechenden genetischen und molekularen Grundlagen der phänotypischen Reaktionsunterschiede zu identifizieren, wurde der Fokus dieser Arbeit auf zwei geographisch diverse Akzessionen - Bay-0 und Sha - gerichtet. Diese zwei Akzessionen zeigten für alle analysierten direkten (Auxinapplikation) und indirekten (TIHE-Phänotyp) Auxinphänotypen deutliche Unterschiede in der Reaktionsstärke (z. B. Abb. 3.3 und 3.6). Außerdem führten Analysen einer aus der Kreuzung der beiden Akzessionen resultierenden F<sub>2</sub>-Generation zur Bestätigung, dass es sich hierbei um quantitativ vererbte Merkmale handeln muss (Abb. 3.5).

Daher erfolgte anschließend die QTL-Kartierung der Auxinreaktionen in der Bay-0 x Sha RIL-Population (Abb. 3.7). Diese ergab, wie bereits durch die Segregationsanalyse angenommen, dass eine Vielzahl an Loci an der jeweiligen Merkmalsausprägung beteiligt sind (Tab. 3.1, Abb. 3.8 und 3.9). Der Vergleich der Position der identifizierten Loci zeigte, dass für die einzelnen Behandlungen sowohl überlappende als auch für einzelne Phänotypen spezifische Regionen existieren. Die identifizierten Regionen weisen einen überwiegend geringen Einfluss auf die Merkmalsausprägung mit einer Spannbreite der erklärten phänotypischen Varianz von 3 bis 25% auf (Tab. 3.1). Trotz der relativ schwachen Effekte der Mehrzahl der QTL-Regionen konnten einige mittels HIFs verifiziert und in einen entsprechenden segregierenden Einzellocus überführt werden (Abb. 3.10, 3.13, 3.14 und 3.15). Dennoch handelt es sich, trotz statistisch signifikanter Unterschiede, um quantitative Reaktionsunterschiede, die eine erfolgreiche Klonierung des zu Grunde liegenden Gens eher unwahrscheinlich erscheinen lassen. Aufgrund der Vielzahl an Genen der großen Zielintervalle ist der Anteil potentieller Kandidatengene enorm und eine Auswahl dieser zu spekulativ.

Daher erwies sich dieser Ansatz zwar als geeignet zur Identifizierung der kausalen Genomregionen, welche die verschiedenen Auxinphänotypen vermitteln. Allerdings zeigte er sich unzureichend, um die entsprechenden kausalen Gene zu identifizieren. Eine Ausnahme stellt hierbei der *GIR2*-Locus dar. Dieser erklärt ungefähr 25% der phänotypischen Varianz (Tab. 3.1). Eine solch starke Beteiligung eines Locus an der phänotypischen Ausprägung stellt eine solide Basis für die erfolgreiche Feinkartierung dar. Daher wurde der Fokus der weiteren Arbeit auf diese Region gerichtet.

#### **4.2 Feinkartierung der *GIR2*-Region**

Neben der starken Beteiligung der *GIR2*-Region an der Ausprägung des TIHE-Phänotyps in den Akzessionen Bay-0 und Sha (Tab. 3.1) konnte dieser Locus mittels HIFs erfolgreich validiert werden (Abb. 3.15). In diesem Fall zeigten die segregierenden Linien der HIFs nicht nur statistisch signifikante Differenzen, sondern auch so starke Reaktionsunterschiede, dass sie eine einfache, qualitative

Klassifikation des Merkmals erlauben. Damit ist eine Grundvoraussetzung zur erfolgreichen Klonierung des *GIR2*-Locus gegeben.

Die initiale Feinkartierung des *GIR2*-Locus resultierte zunächst in widersprüchlichen Ergebnissen, welche auf eine Beteiligung von mehr als einem Locus an der *GIR2*-vermittelten Merkmalsausprägung hinwiesen (Abb. 3.25 und 3.27). Dieses Phänomen ist für QTL-Analysen bekannt, bleibt aber weitgehend unberücksichtigt. Die QTL-Kartierung geht in erster Linie von der Existenz eines Gens pro QTL aus. Wenn es allerdings zu einer genetisch engen Kopplung von mindestens zwei QTL-Regionen kommt, dann beeinflusst dies die Kartierung (Abb. 3.26). Das führt zum Verschmelzen der beiden QTL-Regionen. Im Extremfall, wenn diese Regionen statistisch nicht mehr voneinander trennbar sind, bedeutet dies, dass sich die Effekte beider Loci zu einem großen *ghost*-QTL vereinigen (Wright und Kong, 1997; Seillier-Moiseiwitsch, 1999). In der Regel verhindert deren Existenz die Klonierung der zu Grunde liegenden einzelnen Gene aufgrund der quantitativen Merkmalsausprägung.

Die ausgeprägten, qualitativen Reaktionsunterschiede der für den *GIR2*-Locus segregierenden Kartierungspopulation ermöglichten jedoch die Identifizierung von zwei verschiedenen Rekombinantentypen. Diese erlaubten die genetische Trennung des *GIR2*-Locus in zwei unabhängige Regionen – *GIR2.1* und *GIR2.2* (Abb. 3.25 und 3.27). Die entsprechende Phänotypisierung nachfolgender Generationen ergab, dass das Sha-Allel der jeweiligen Region unabhängig voneinander zum gesteigerten Hypokotylwachstum bei erhöhten Temperaturen führt (Abb. 3.27). Demnach verbergen sich mindestens zwei für die Ausprägung des TIHE-Phänotyps verantwortliche Loci im *GIR2*-Intervall, welcher als ein QTL identifiziert wurde. Somit stellt die Trennung des *GIR2*-Locus in zwei verantwortliche Unterregionen mittels Rekombinationsanalyse den experimentellen Beweis für die in der Theorie bekannten *ghost*-QTLs dar.

Die Validierung, dass die genetisch getrennten Regionen, *GIR2.1* und *GIR2.2*, unabhängig voneinander an der Ausprägung des TIHE-Phänotyps beteiligt sind, ergibt die seltene Möglichkeit die jeweiligen kausalen Gene eines solchen *ghost*-QTLs zu identifizieren. Die sichere Identifizierung der Kandidatengene beider Regionen erfordert eine weitere Feinkartierung. So umfasst das *GIR2.1*-Intervall mit einer Größe von ungefähr 2 Mbp 550 verschiedene Gene und *GIR2.2* bei einer Größe von 3,4 Mbp mehr als 1000 potentielle Kandidatengene (Abb. 3.25). Beim TIHE-Phänotyp handelt es um eine indirekte Auxinreaktion. Die Temperaturerhöhung von 20°C auf 28°C führt zur gesteigerten Auxinbiosynthese und dementsprechend zum Anstieg der endogenen Auxinkonzentration (Gray *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 2011). Bekannte Auxinkomponenten des zu Grunde liegende Mechanismus in *A. thaliana* befanden sich nicht im Zielintervall für *GIR2.1*. Dies trifft auch für das Zielintervall von

*GIR2.2* zu. Außerdem zeigten die für den *GIR2*-Locus segregierenden Linien der HIFs 84 und 163 zum einen nur sehr geringe, für vereinzelte Konzentrationen Reaktionsunterschiede. Zum anderen reagierten diese Linien auch partiell konträr in ihre Auxinantwort (Abb. 3.17). Daher handelt es sich bei Auxin, wenn überhaupt nur um eine sekundäre Komponente der *GIR2*-vermittelten TIHE-Reaktion.

#### 4.3 Die Temperaturreaktion in Pflanzen

Aufgrund der relativ hohen Anzahl an potentiellen Kandidatengen für den *GIR2.1*- und *GIR2.2*-Locus stellte sich zunächst die Frage, wie Pflanzen überhaupt Temperaturunterschiede perzipieren und in welchen molekularen und phänotypischen Veränderungen diese resultieren können. So ist für verschiedene *A. thaliana*-Akzessionen bekannt, dass ein Temperaturgradient von mehr als 30°C tolerierbar ist. Dieser große Toleranzbereich beruht vermutlich auf der Plastizität der pflanzlichen Entwicklung (Wilczek *et al.*, 2009). Die meisten mechanistischen Studien fokussierten sich in erster Linie auf Signalwege, welche zu einer Stresstoleranz gegenüber extremen Temperaturen führen. So dienen bspw. kühle Temperaturen zur Akklimatisierung der Pflanzen gegen Frost bzw. Wärme gegen Hitzestress (Penfield, 2008). Allerdings beeinflussen auch geringfügige Temperaturveränderungen die pflanzliche Entwicklung (McClung und Davis, 2010). So führen diese bspw. zu Modifikationen im photosynthetischen Potential (Bernacchi *et al.*, 2009), Blühzeitpunkt (Blazquez *et al.*, 2003; Balasubramanian *et al.*, 2006) oder Samenkeimung (Argyris *et al.*, 2005).

Innerhalb der letzten Dekade wurden intensiv verschiedene Temperaturreaktionen analysiert (McClung und Davis, 2010). Hierbei handelt es sich um veränderte Phytohormonreaktionen oder Modifikationen des Blühzeitpunkts, der circadianen Rhythmik, der Lichtsignalperzeption sowie der bereits erwähnten Akklimatisierung bezüglich extremer Temperaturen (Penfield, 2008; McClung und Davis, 2010). Dabei wird eine Vielzahl von pflanzlichen Prozessen durch die Temperaturperzeption, sogenannte „Thermometer“, reguliert (McClung und Davis, 2010). Bei Mikroorganismen und in tierischen Systemen handelt es sich bei diesen „Thermometern“ um diverse biophysikalische Prozesse wie das Schmelzen sekundärer RNA-Strukturen in Bakterien (Johansson *et al.*, 2002) oder das RNA-Spleißen und die Translationseffizienz in Pilzen (Diernfellner *et al.*, 2005) sowie die Aktivierung von Ionenkanälen in Insekten (Rosenzweig *et al.*, 2005; Hamada *et al.*, 2008). Allerdings ist in Pflanzen bisher die Identität solcher Thermometer vollkommen unbekannt. Daher kann die Identifizierung der kausalen Gene für *GIR2.1* und *GIR2.2* dazu beitragen, den Mechanismus der pflanzlichen Temperaturperzeption in *A. thaliana* besser zu verstehen.

#### 4.3.1 *ELF3* - Kandidatengen des *GIR2.1*-Locus

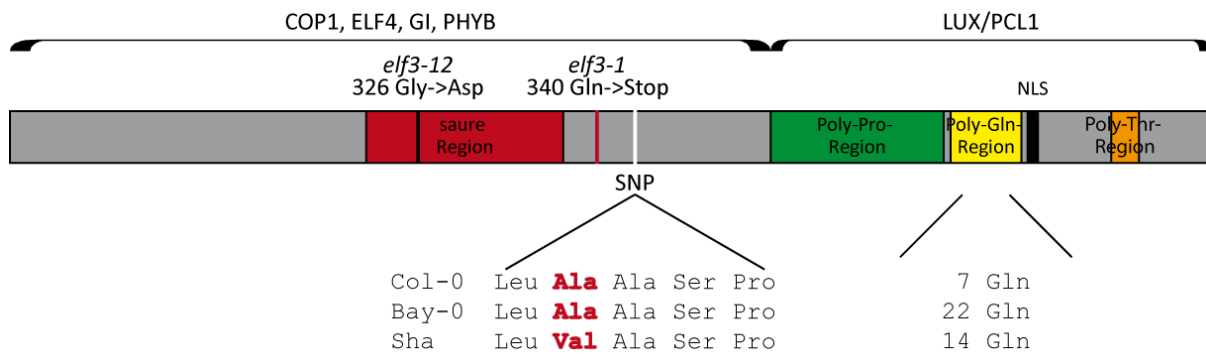
Trotz des relativ großen Zielintervalls von *GIR2.1* mit 2 Mbp und ca. 550 verschiedenen Loci konnte ein potentiell Kandidatengen ermittelt werden - *EARLY FLOWERING 3 (ELF3, At2g25930)*. Dieses Gen wurde auch in QTL-Kartierungen bezüglich SAS-Reaktionen als verantwortlicher Locus identifiziert (Jimenez-Gomez *et al.*, 2010; Coluccio *et al.*, 2011). In ihrer Ausprägung ähneln die Phänotypen der SAS-Reaktion stark der Temperaturantwort (Abb. 3.15. und 3.20). Daher handelt es sich bei *ELF3* um einen geeigneten Kandidaten für den *GIR2.1*-Locus.

*ELF3* nimmt eine zentrale Funktion in der Regulation der circadianen Rhythmik ein und beeinflusst daher zahlreiche Merkmale. So zeigt die *loss-of-function*-Mutante *elf3-1* pleiotrope Phänotypen wie frühzeitiges Blühen, Veränderung der circadianen Rhythmik und verstärktes Hypokotylwachstum im Licht (Zagotta *et al.*, 1996; McWatters *et al.*, 2000; Covington, 2001; Liu *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2009). Außerdem führen erhöhte Umgebungstemperaturen zu einer Verstärkung des schon gesteigerten Hypokotylwachstums bei 20°C (Abb. 3.23). Übereinstimmend mit der Funktion von *ELF3* in der Regulation der circadianen Rhythmik konnten Reaktionsunterschiede der am *GIR2*-Locus segregierenden Linien der HIFs nur in Abhängigkeit von einer wechselnden Hell-Dunkelphase gezeigt werden (Abb. 3.15 und 3.21). Da unter DL-Bedingungen und im Dunkeln keine Unterschiede in der Temperaturreaktion zwischen den Linien der HIFs detektierbar waren, ist für die Ausprägung des TIHE-Phänotyps die korrekte Funktionsweise der inneren Uhr notwendig. Somit könnte es sich bei *ELF3* um das entsprechende Kandidatengen des *GIR2.1*-Locus handeln.

Allerdings ergaben die genetischen Analysen eine komplexe Vererbungsmodalität. Das fehlende, rezessive Allel im Col-0-Hintergrund der *elf3-1*-Mutante führte zum gleichen Phänotyp der stärkeren Hypokotylelongation bei erhöhten Umgebungstemperaturen (Abb. 3.23), wie das dominante Sha-Allel (Abb. 3.24). Ein solches genetisches Szenario könnte aber mittels eines im Folgenden detaillierter beschriebenen Modells erklärt werden, wobei zunächst hintergrundspezifische Interaktionen mit dem *ELF3*-Locus vernachlässigt werden.

#### 4.3.2 Mögliche Funktionsweise von *ELF3* in der Temperaturreaktion von Bay-0 und Sha

Bei *ELF3* handelt es sich um ein multifunktionales Protein, welches Interaktionen mit diversen Proteinen der Lichtsignalkaskade und der inneren Uhr eingehen kann (Abb. 4.1 und 4.2; Liu *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2008; Nusinow *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2012). So interagiert der N-Terminus von *ELF3* (As 1 bis 259) mit Mitgliedern der Phytochromphotorezeptoren. Hierbei handelt es sich vorrangig um PHYTOCHROME B (*PHYB*; Liu *et al.*, 2001).



**Abb. 4.1: ELF3-Proteinstruktur verschiedener *A. thaliana*-Akzessionen**

Zusammenfassende Darstellung der ELF3-Interaktionspartner aus *in vivo*, *in vitro* bzw. Hefe-Dihybrid-Interaktionsanalysen: COP1, ELF4, GI und PHYB interagieren mit dem N-Terminus und/oder der zentralen Region von ELF3 (Liu *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2008; Nusinow *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2012). Der C-Terminus von ELF3 ist für die Ausbildung des ECs mit LUX/PCL1 essentiell (Nusinow *et al.*, 2011).

Vergleich der ELF3-Proteinsequenz der Akzessionen Col-0, Bay-0 und Sha: Schematische Darstellung der Proteinstruktur (Hicks *et al.*, 2001) zeigt nichtsynonymen SNP an Position 362 mit Substitution des konservierten Alanins (Ala) durch Valin (Val) und der variablen Anzahl von Glutamin (Gln)-Resten ab Position 544 (Coluccio *et al.*, 2011; Jimenez-Gomez *et al.*, 2010, Undurraga *et al.*, 2012). Außerdem ist die *elf3-12*-Mutation an Position 236 von Glycin (Gly) zu Aspartat (Asp) (Kolmos *et al.*, 2011) bzw. die *elf3-1*-Mutation an Position 340 von Gln zu einem vorzeitigen Stopcodon dargestellt (Hicks *et al.*, 2001). Leu, Leucin-; Ser, Serin-; Pro, Prolin-; Thr, Threoninreste; NLS, Nukleuslokalisierungssignal, weitere Abk. siehe Text

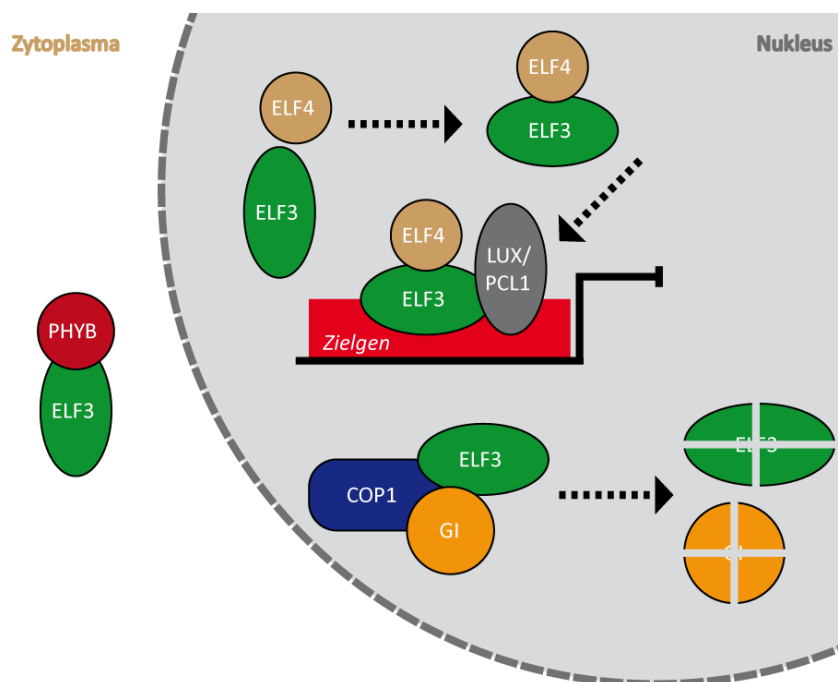
Abb. wurde nach Coluccio *et al.* (2011) verändert.

Der zentrale Abschnitt von ELF3 (As 261 bis 484) interagiert u. a. mit EARLY FLOWERING 4 (ELF4; Abb. 4.1 und 4.2). Dies dient der Verankerung des im Komplex mit ELF4 vorliegenden ELF3-Proteins im Zellkern (Herrero *et al.*, 2012). Zusammen mit ELF4 und einem weiteren Interaktionspartner, LUX ARRHYTHMO/PHYTOCLOCK 1 (LUX/PCL1), agiert ELF3 in einem Corepressorkomplex, dem *Evening Complex* (EC; Nusinow *et al.*, 2011; Herrero und Davis, 2012; Herrero *et al.*, 2012). Dieser reprimiert u. a. die Expression von *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4* (*PIF4*) und *PIF5/PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE 6* (*PIL6*), die für wachstumsregulierende Transkriptionsfaktoren kodieren (Nusinow *et al.*, 2011; Nomoto *et al.*, 2013).

Die kürzlich als schwaches Allel identifizierte *elf3-12*-Mutante (Abb. 4.1) zeigte abgeschwächte Repressoraktivität (Kolmos *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2012). Allerdings wird die Interaktion mit ELF4 durch die Mutation nicht gestört (Kolmos *et al.*, 2011). Außerdem befindet sich in der ELF4-Interaktionsdomäne von ELF3 die *elf3-1*-Mutation (Hicks *et al.*, 2001). Diese Mutation führt zu einem vorzeitigen Stopcodon. Damit ist maximal ein verkürztes ELF3-Protein zu erwarten, welches wahrscheinlich der sofortigen Degradierung unterliegt und nicht mehr als Interaktionspartner zur Verfügung steht. Darüber hinaus ist in diesem Abschnitt der einzige bekannte nichtsynonyme SNP zwischen Bay-0 und Sha in der kodierenden Sequenz von *ELF3* lokalisiert (Abb. 4.1). Dieser ist

vorwiegend für Akzessionen aus Zentralasien bekannt (<http://1001genomes.org/>), woher die Sha-Akzession ursprünglich stammt (<http://dbsgap.versailles.inra.fr> und <http://arabidopsis.info/>). Daher könnte es sich hierbei um eine seltenere ELF3-Proteinvariante handeln. Allerdings zeigten die Analysen mit der *elf3-12*-Mutante, dass zwar die Mutation die ELF4-Interaktion nicht stört, es aber zur abgeschwächten Repressoraktivität kommt (Kolmos *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2012). Da sich der SNP in der gleichen Proteininteraktionsdomäne befindet, ist eine ähnliche Funktion für das *ELF3*-Allel der Sha-Akzession anzunehmen. Entsprechende Analysen zur Proteininteraktion *in planta*, *in vitro* bzw. mittels Hefe-Dihybrid sowie zur Repressoraktivität mit dem *ELF3*-Allel der Sha-Akzession stehen noch aus.

Weiterhin wird die Hypothese über eine ähnliche Funktion des ELF3-12- und ELF3-Sha-Proteins gestützt, in dem in beiden Fällen die zelluläre Abundanz der ELF3-Proteinvarianten erhöht ist (Kolmos *et al.*, 2011; S. Davis, persönliche Kommunikation). Aufgrund der gesteigerten zytoplasmatischen ELF3-Konzentration ist eine Konkurrenzsituation zwischen ELF4 und PHYB um ELF3 als Interaktionspartner möglich (Abb. 4.3). So könnte die veränderte ELF3-Proteinsequenz der Sha-Akzession dazu führen, dass die Interaktion zu Gunsten mit PHYB verschoben ist. Ein solches Szenario wird für das schwache Allel *elf3-12* angenommen, für das Expressionsanalysen eine verstärkte *PIF4*-Transkriptakkumulation im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Kolmos *et al.*, 2011).



**Abb. 4.2: ELF3-Interaktionspartner**

Zusammenfassende Darstellung exemplarischer ELF3-Interaktionspartner aus *in vivo*, *in vitro* bzw. Hefe-Dihybrid-Interaktionsanalysen (Liu *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2008; Nusinow *et al.*, 2011; Herrero und Davis, 2012; Herrero *et al.*, 2012). Während der Nacht interagiert ELF3 mit ELF4 im Nukleus. Dies führt zur Assoziation mit LUX/PCL1 im EC und der Bindung an entsprechende Ziel-DNA, was die Repression der Expression entsprechender Zielgene zur Folge hat. Außerdem kommt es während der Dunkelphase zur physikalischen Interaktion von ELF3

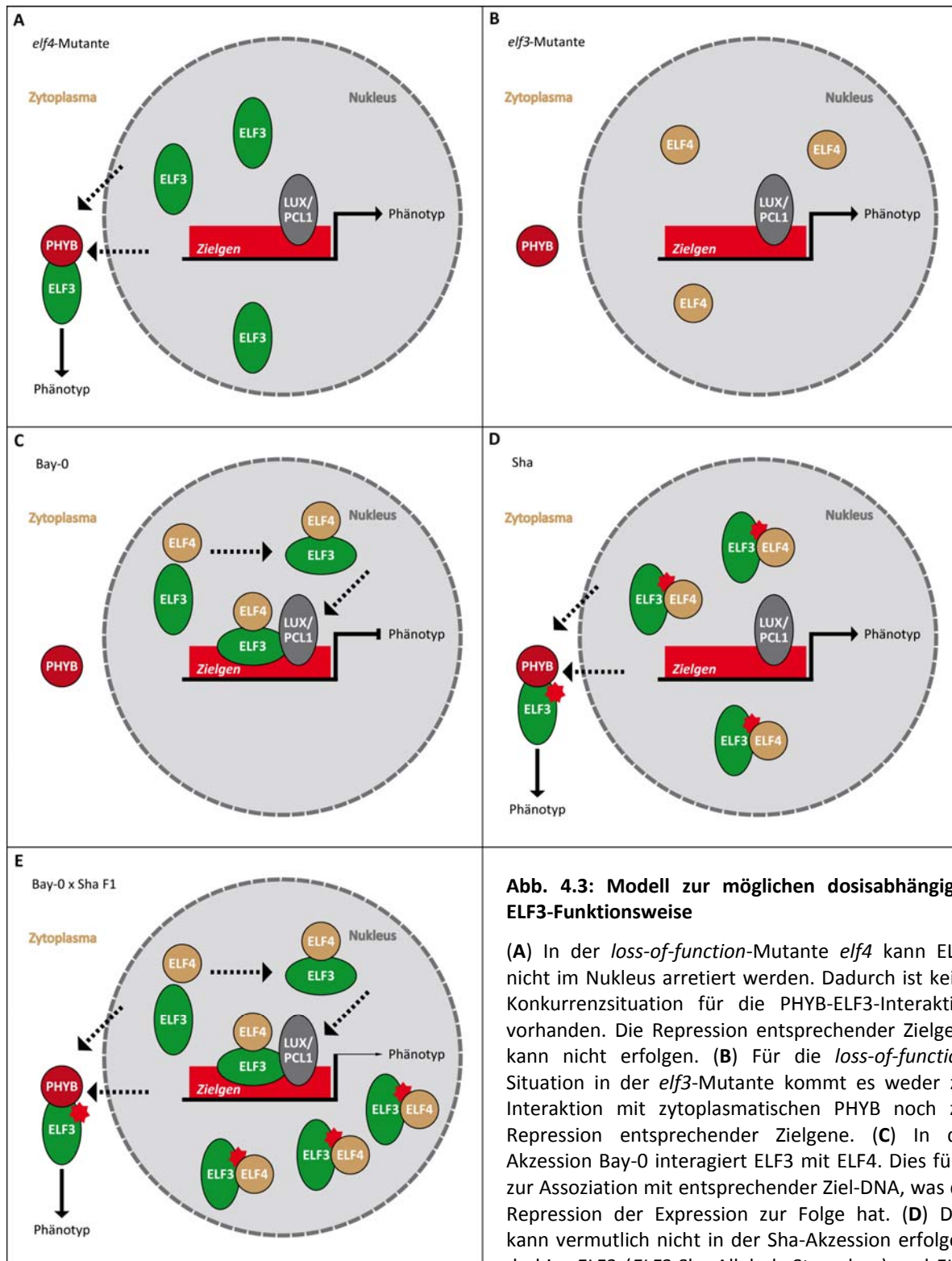
mit GI. Diese werden durch die E3-Ligase COP1 proteolytisch degradiert. Im Zytoplasma interagiert der N-Terminus von ELF3 mit PHYB (Liu *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2008; Nusinow *et al.*, 2011; Herrero und Davis, 2012; Herrero *et al.*, 2012). Abk. siehe Text

Demnach kann es nur zur Repressoraktivität von ELF3 kommen, wenn ein bestimmter Schwellenwert der ELF4-gebundenen ELF3-Konzentration im Zellkern überschritten ist (Abb. 4.3; Herrero *et al.*, 2012). Wenn es sich um ein hypomorphes *ELF3*-Allel der Sha-Akzession handelt, wäre es möglich, dass der heterozygote Zustand nicht ausreichend ist, um diesen Schwellenwert einer funktionellen ELF3-ELF4-Interaktion zu überschreiten. Damit könnte der lange Hypokotylphänotyp der F1-Generation aus der Kreuzung 84-S x 84-B erklärt werden (Abb. 3.24), wo nur eine Kopie des funktionellen *ELF3*-Allels aus Bay-0 vorliegt (Abb. 4.3). Weitere Hinweise zur dosisabhängigen Funktionsweise von ELF3 geben Überexpressionslinien. So führt die Überexpression von *ELF3* im *elf4*-Hintergrund weiterhin zur Corepression entsprechender Zielgene (Herrero *et al.*, 2012).

Um die Hypothese der dosisabhängigen Funktionsweise zu überprüfen, ist die veränderte subzelluläre Lokalisierung der entsprechenden Allelvarianten des ELF3-Proteins unter den gegebenen Laborbedingungen zu überprüfen. In diesem Zusammenhang könnten auch Coexpressionsstudien mit den Interaktionspartnern ELF4, PHYB, GI und COP1 weiteren Aufschluss über eine eventuell modifizierte subzelluläre Lokalisation und daher veränderte Funktion von ELF3 geben. Idealerweise sollten diese Analysen bei verschiedenen Temperaturbedingungen durchgeführt werden. Allerdings stehen solche technischen Möglichkeiten bisher nur begrenzt in der Mikroskopie zur Verfügung. Daher wäre ein indirekter Indikator der veränderten subzellulären Lokalisation und Funktion die Bestimmung der Transkriptlevel der *ELF3*-Zielgene, allen voran *PIF4*. Weiterhin können Chromatin-Immunopräzipitationsversuche veränderte DNA-Assoziation der *ELF3*-Allelvarianten z. B. an den *PIF4*-Promotor aufzeigen. Diese Analysen sind relativ einfach bei verschiedenen Temperaturbedingungen durchzuführen.

Außerdem wären Analysen von Polymorphismen zwischen Bay-0 und Sha in der *ELF4*-kodierenden Sequenz von Interesse, welche zur Interaktion mit der zentralen Proteinsequenz von ELF3 nötig sind. Entsprechend der öffentlich verfügbaren Genotypdaten (Loudet *et al.*, 2002) liegt im Fall der HIF 84 *ELF4* homozygot als Bay-0-Allel vor, wohingegen für die HIF 163 das *ELF4*-Sha-Allel homozygot vorliegt. Beide HIFs zeigten starke Unterschiede der TIHE-Reaktion je nach Präsenz des Bay-0 oder Sha-Allels am *GIR2*-Locus (Abb. 3.15, 3.25 und 3.27). Demnach ist die allelische Ausprägung von *ELF4* für die Interaktion mit ELF3 wahrscheinlich uninteressant oder von untergeordneter Bedeutung. Gleichwohl sollte die Sequenz mittels Sequenzierreaktion auch praktisch validiert werden und sich anschließende Interaktionsanalysen würden entsprechende Erkenntnisse über die ELF3-ELF4-Interaktion ergeben.





**Abb. 4.3: Modell zur möglichen dosisabhängigen ELF3-Funktionsweise**

(A) In der *loss-of-function*-Mutante *elf4* kann ELF3 nicht im Nucleus arretiert werden. Dadurch ist keine Konkurrenzsituation für die PHYB-ELF3-Interaktion vorhanden. Die Repression entsprechender Zielgene kann nicht erfolgen. (B) Für die *loss-of-function*-Situation in der *elf3*-Mutante kommt es weder zur Interaktion mit zytoplasmatischen PHYB noch zur Repression entsprechender Zielgene. (C) In der Akzession Bay-0 interagiert ELF3 mit ELF4. Dies führt zur Assoziation mit entsprechender Ziel-DNA, was die Repression der Expression zur Folge hat. (D) Dies kann vermutlich nicht in der Sha-Akzession erfolgen, da hier ELF3 (*ELF3*-Sha-Allel als Sternchen) und ELF4

zwar interagieren, allerdings nicht funktional sind. Damit kommt es zu keiner Repression der Expression, dafür aber zur Interaktion mit PHYB, die durch den SNP nicht gestört zu sein scheint. (E) Im Fall der heterozygoten F1 (mit jeweils einer Kopie des *ELF3*-Bay-0- und -Sha-Allels) entsteht eine Konkurrenzsituation um die ELF3-Interaktion. Die Menge an im Nucleus lokalisierten, funktionellen ELF3-ELF4-Komplexen reicht vermutlich nicht aus, um die Repression der Expression erfolgreich durchzuführen. Abk. siehe Text

Modell basiert auf Daten von Kolmos *et al.*, 2011; Herrero und Davis, 2012; Herrero *et al.*, 2012.

Weiterhin interagiert der zentrale Abschnitt von ELF3 (As 261 bis 484) mit einer weiteren Komponente der circadianen Rhythmik – GIGANTEA (GI; Abb. 4.1 und 4.2; Yu *et al.*, 2008). Hierbei handelt es sich um einen potentiellen Kandidaten für den *GIR1*-Locus. Die Validierung der *GIR1*-Region (Abb. 3.14) führte zu entgegengesetzten Reaktionen des TIHE-Phänotyps, in dem das Bay-0-Allel den langen und das Sha-Allel den kurzen Hypokotylphänotyp vermittelt. Zum Vergleich: In den Parentalakzessionen und im Fall von *GIR2.1* bzw. *GIR2.2* vermittelt das Bay-0- den kurzen und das Sha-Allel den langen Phänotyp (z. B. Abb. 3.6, 3.15 und 3.27). Dies deutet an, dass die *GIR1*-Region womöglich einen negativen Beitrag zur Merkmalsausprägung beisteuert. Allerdings wurde eine starke additive Interaktion zwischen beiden Loci identifiziert (Tab. A.5). Wie die exakte genetische Interaktion zwischen beiden QTL-Regionen erfolgt, ist daher mit spezifischen Pflanzenmaterial im Detail mit zu testen. Aufgrund der eindeutigen genetischen Trennung des *GIR2.1*- und *GIR2.2*-Locus (Abb. 3.27) können für weitere Analysen u. a. Nachkommen der 84-S x 84-B F3-Generation genutzt werden.

Jedoch wird die genetische Interaktion der *GIR1*-Region mit dem *GIR2*-QTL durch die molekulare Wechselwirkung der beiden potentiellen Kandidaten GI (*GIR1*-Kandidat) und ELF3 (*GIR2.1*-Kandidat) gestützt. So kommt es durch die physikalische Interaktion von ELF3 mit GI während der Nachtstunden zur proteolytischen Degradierung von GI. Dies wird durch die E3-Ligase CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) vermittelt, welche auch ELF3 der proteolytischen Degradierung zuführt (Abb. 4.2; Yu *et al.*, 2008). Wiederum ist unter Blaulicht bzw. während der Tagesstunden die ELF3-Proteinabundanz gering und GI liegt stabil vor (Yu *et al.*, 2008).

Es ist anzunehmen, dass nicht nur Hell-Dunkelphasen, sondern auch veränderte Temperaturen die circadiane Rhythmik beeinflussen und somit zu Unterschieden in der Proteinaktivität bzw. -stabilität beitragen. Unterstützend hierzu wurde *GI* als potentieller Kandidat in weiteren QTL-Kartierung bezüglich des Temperatureinflusses auf die circadiane Rhythmik in der Cvi x Ler RIL-Population identifiziert (Edwards *et al.*, 2005; Boikoglou *et al.*, 2011). Damit würde dieses Szenario die Hypothese unterstützen, dass es sich bei *ELF3* um das Kandidatengen des *GIR2.1*-Locus handelt.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der molekularen Funktionsweise würde die Veränderung des nukleären Transportes des ELF3-Sha-Proteins darstellen. Dieser ist essentiell für die korrekte Funktion der circadianen Rhythmik in Pilzen und im tierischen System (Tataroglu und Schafmeier, 2010; Herrero und Davis, 2012). Auch in diesem Fall könnte ein entsprechender Schwellenwert von ELF3 im Zellkern aufgrund modifizierter Im- und/oder Exportraten nicht erreicht werden. Aus der Referenzakzession Col-0 ist bekannt, dass ELF3 im Zellkern diurnal akkumuliert und die höchste Proteinabundanz während der frühen Nachtstunden erreicht. Dementsprechend liegt ELF3 als

Bestandteil des ECs mit LUX/PCL1 und ELF4 im Zellkern vor (Nusinow *et al.*, 2011). Da allerdings der exakte Im- und Exportmechanismus bisher unbekannt ist, bleibt diese Möglichkeit sehr spekulativ. Hinzu kommt, dass nur unzureichend untersucht wurde, ob *ELF3* in den Akzessionen Bay-0 und Sha unter diurnalen Bedingungen unterschiedlich exprimiert wird bzw. die subzelluläre Lokalisation oder Proteinstabilität verändert ist (Jimenez-Gomez *et al.*, 2010; Coluccio *et al.*, 2011).

Eine weitere Quelle der natürlichen Variation von *ELF3* stellt der InDel in der glutaminreichen Region des C-Terminus zwischen den beiden Akzessionen dar (Abb. 4.1). Hierbei handelt es sich um eine zwischen verschiedenen *A. thaliana*-Akzessionen hochvariable Region. So reicht die Spannbreite von sieben (z. B. Col-0) bis 29 Resten (Kas-1 und Kas-2), dabei hat Bay-0 22 und Sha 14 Glutaminreste (Tajima *et al.*, 2007; Jimenez-Gomez *et al.*, 2010; Coluccio *et al.*, 2011; Undurraga *et al.*, 2012). Für circadiane Parameter wie die Periode oder Phase konnte eine Korrelation mit der Variation der Glutaminanzahl in *ELF3* gefunden werden (Tajima *et al.*, 2007). Allerdings wurde keine offensichtliche Assoziation zwischen der Anzahl der Glutaminreste und des TIHE-Phänotyps für verschiedene Akzessionen gefunden (Daten nicht gezeigt). Dies ist übereinstimmend mit Analysen von Undurraga *et al.* (2012), bei denen auch für weitere *ELF3* assoziierte Phänotypen, wie dem Blühzeitpunkt oder der Petiolenlänge, keine direkte Korrelation mit der Anzahl der Glutaminreste ersichtlich war. Allerdings führten einige Varianten der Anzahl von Glutaminresten zu phänotypisch ähnlichen Reaktionen wie in der *elf3-4*-Mutante (Undurraga *et al.*, 2012), welche ihrerseits ein verkürztes Protein mit fehlendem C-Terminus aufweist (Hicks *et al.*, 2001). Daher ist anzunehmen, dass für bestimmte *ELF3*-vermittelte Phänotypen wie das Hypokotylwachstum eine funktionelle Anzahl von Glutaminresten notwendig ist.

Allerdings müssen diese, um vollständig funktionell zu sein, in einem spezifischen Hintergrund einer bestimmten Akzession sein. Daher wird angenommen, dass entsprechende modifizierende Proteine notwendig sind (Undurraga *et al.*, 2012). Jedoch wurde bisher kein für die Glutaminreste spezifischer Interaktionspartner identifiziert, so dass die Natur modifizierender Proteine rein spekulativ bleibt. Ein ähnliches Beispiel existiert für die an der Leucin-Biosynthese beteiligte ISOPROPYL MALATE ISOMERASE SUBUNIT 1 (*IIL1*). Die Wiederholung mehrerer TTC/GAA-Triplets führt zu einer temperaturbedingten Reduktion der Enzymaktivität und damit zu Wachstumsabnormalitäten. So zeigte die bei 27°C unter Kurztag (KT)-Bedingungen angezogene Akzession Bur-0 eine extreme Petiolenelongation, deformierte Blätter und eine frühzeitige Mortalität. Diese Phänotypen wurden durch Anzucht bei 30°C verstärkt, waren aber nicht bei 23°C zu beobachten (Sureshkumar *et al.*, 2009).

Demnach kann die unterschiedliche Anzahl der Glutaminreste von ELF3 zwischen Bay-0 und Sha sehr wohl als Ursache für den verschieden ausgeprägten TIHE-Phänotyp in Betracht kommen. Zumal diese essentiell für die circadiane Funktion von ELF3 ist (Herrero *et al.*, 2012). Aus tierischen Systemen ist bekannt, dass eine Kernkomponente der circadianen Rhythmik – CLOCK (CLK) - auch eine glutaminreiche Region aufweist, die für deren Funktion als Histonacetyltransferase essentiell ist (Doi *et al.*, 2006). Für *A. thaliana* sind allerdings bisher keine essentiellen Komponenten der circadianen Rhythmik bekannt, die eine direkte Funktion in der Histonmodifikation aufweisen. Obwohl ELF3 sowie ELF4 zwar keine bekannte Funktion innehaben, dafür aber DNA-Assoziation zeigen, könnte deren Rolle in der Veränderung der Chromatinstruktur sein. Dies wäre bspw. durch Rekrutierung von chromatinmodifizierenden Komplexen möglich, wie dies bereits für andere Komponenten der inneren Uhr bekannt ist (Herrero und Davis, 2012; Wang *et al.*, 2013). So wird solch eine chromatinmodifizierende Funktion für COP1 angenommen (Herrero und Davis, 2012), welches zudem mit dem N-Terminus von ELF3 (As 1 bis 259) interagiert (Abb. 4.1; Yu *et al.*, 2008). Hinzu kommt, dass sich der Aufbau des Chromatins in Abhängigkeit von der Temperatur verändert (Kumar und Wigge, 2010). Daher wäre zu klären, inwiefern ELF3 an der Temperaturreaktion beteiligt ist und wie dies v. a. in Bay-0 und Sha mechanistisch erfolgt.

Um die Beteiligung von ELF3 an der Temperaturreaktion detailliert zu analysieren, ist die weitere Feinkartierung und die sich anschließende Komplementationsanalyse zur Bestätigung von *ELF3* als kausales Gen des *GIR2.1*-Locus unerlässlich. Wenn dem so sein sollte, wäre weiterhin zu prüfen, ob die Reaktionsunterschiede des *GIR2.1*-vermittelten TIHE-Phänotyps auf die unterschiedliche Anzahl der Glutaminreste oder auf den As-Austausch von ELF3 zurückzuführen sind. Hierfür müssten entsprechende chimäre Konstrukte generiert werden. Die eine Variante würde an Position 362 der Proteinvariante aus Bay-0 entsprechen und im C-Terminus die für Sha-spezifischen 14 Glutaminreste aufweisen. Die zweite Variante der chimären Konstrukte entspricht N-terminal der Sha-Akzession und der C-Terminus weist die für Bay-0-spezifischen 22 Glutaminreste auf.

Für *ELF3* als potentielles Kandidatengen sprechen zusätzliche Phänotypen. Analysen weiterer Temperaturphänotypen der am *GIR2*-Locus segregierenden HIFs ergaben, dass auch diese unterschiedlich stark ausgeprägt waren. So führen erhöhte Temperaturen nicht nur zur unterschiedlich starken Hypokotylelongation von Keimlingen (Abb. 3.15), sondern auch zu veränderten Reaktionen des Petiolenwachstums und der Blattfläche von Primärblättern in Keimlingen (Abb. 3.20). Hierbei handelt es sich um Phänotypen, welche zudem für *elf3*-Mutanten beschrieben wurden (Zagotta *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001). Solche Phänotypen sind auch aus der SAS-Reaktion bekannt, in der Veränderungen des Anteils des Dunkelrotlichts zum Rotlicht zu verstärkten Wachstumsraten

führen (Gray *et al.*, 1998; Huq und Quail, 2002; Balasubramanian *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2008; Koini *et al.*, 2009). Diese Veränderungen in der Zusammensetzung des Lichts werden durch den Interaktionspartner PHYB perzipiert (Lorrain *et al.*, 2008). Interessanterweise ergaben allerdings Analysen des Hypokotylwachstums bei verschiedenen Lichtqualitäten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Linien der HIFs (Abb. 3.22). Da die am *GIR2*-Locus segregierenden Linien der HIFs nicht unterschiedlich auf Licht verschiedener Wellenlängen reagierten, jedoch verschieden für den TIHE-Phänotyp waren, scheint es sich hierbei nur um phänotypisch ähnliche Reaktionen zu handeln, denen unterschiedliche molekulare Mechanismen zu Grunde liegen (Koini *et al.*, 2009).

Obwohl die *GIR2.1*-Region mit einer Größe von ca. 2 Mbp (Abb. 3.25) diverse Gene umfasst, zeichnet sich *ELF3* aus oben genannten Gründen als ein vielversprechender Kandidat aus. Weiterhin spricht für *ELF3* als Kandidaten die Regulation der *PIF4*-Expression, wobei *PIF4* eine bekannte Komponente der Temperaturreaktion darstellt (Koini *et al.*, 2009; Stavang *et al.*, 2009; Leivar und Quail, 2011; Nomoto *et al.*, 2012). *PIF4* selbst liegt allerdings außerhalb des *GIR2*-Konfidenzintervalls, so dass es als potentieller Kandidat nicht in Betracht gezogen werden kann. Allerdings werden durch *PIF4* wiederum mannigfaltige Reaktionen induziert, welche näher für den *GIR2*-Locus charakterisiert wurden.

#### 4.4 Phytohormonabhängige Regulation des *GIR2*-vermittelten TIHE-Phänotyps

Sollte es sich bei *ELF3* um das kausale Gen des *GIR2.1*-Locus handeln und es entsprechend, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, zu einer akzessionsspezifischen Veränderung der Funktionsweise kommen, ist auch eine veränderte Regulation von *downstream*-Komponenten zu erwarten. Allen voran zeichnet sich *PIF4* als ideale *downstream*-Komponente von *ELF3* aus (Abb. 4.4), da es einen zentralen Regulator sowohl der thermoregulatorischen als auch der photoperiodischen Kontrolle des Hypokotylwachstums darstellt (Huq und Quail, 2002; Lorrain *et al.*, 2008; Koini *et al.*, 2009; Stavang *et al.*, 2009; Leivar und Quail, 2011; Nozue *et al.*, 2011; Hornitschek *et al.*, 2012; Nomoto *et al.*, 2013).

Dabei wird die Expression von *PIF4* direkt durch den EC bestehend aus *ELF3*, *ELF4* und *LUX/PCL1* reguliert (Nusinow *et al.*, 2011; Nomoto *et al.*, 2013). Unter KT-Bedingungen wird *PIF4* vorrangig zum Ende der Nachtphase und während der Tagesstunden transkribiert (Niwa *et al.*, 2009), wohingegen unter LT-Bedingungen es exklusiv während des Tages exprimiert wird. Unter diesen Bedingungen unterliegt *PIF4* der lichtaktivierten, PHYB-vermittelten Degradierung (Lorrain *et al.*, 2008). Mittels dieses Mechanismus, der durch PHYB und die circadiane Rhythmik vermittelten Regulation, liegt die *PIF4*-Aktivität stabil zum Ende der Nacht vor (Breton und Kay, 2007; Nozue *et al.*, 2007; Niwa *et al.*,



Neben Komponenten der inneren Uhr reguliert PIF4 die Expression diverser auxinassoziierter Gene (Abb. 4.4; Gray *et al.*, 1998; Koini *et al.*, 2009; Stavang *et al.*, 2009; van Zanten *et al.*, 2009; Franklin *et al.*, 2011; Nomoto *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012). Durch die gesteigerte Expression der Biosynthesegene *YUC8*, *YUC9*, *SAV3/TAA1* und *CYP79B2* liegt die zelluläre IAA-Konzentration erhöht vor (Stavang *et al.*, 2009; Franklin *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). Interessanterweise erfolgt die Bindung von PIF4 an den *CYP79B2*- bzw. *SAV3/TAA1*-Promotor temperaturabhängig (Franklin *et al.*, 2011). Es ist daher anzunehmen, dass die temperaturabhängige PIF4-Stimulation der Auxinbiosynthese auch auf der Ebene der Zugänglichkeit des Chromatins reguliert wird (Proveniers und van Zanten, 2013). Dies könnte erklären, warum *PIF4*-Überexpressionslinien noch eine verbleibende Temperaturreaktion aufweisen (Stavang *et al.*, 2009). Zusätzlich kommt hinzu, dass die *PIF4*-Expression in Mutanten verstärkt ist, welche einen Defekt im Chromatinaufbau aufweisen (Kumar *et al.*, 2012). Dies ist übereinstimmend mit der Annahme, dass COP1, ein Interaktionspartner von ELF3, einer Chromatin modifizierenden Funktion nachkommen könnte (Herrero und Davis, 2012). Außerdem verändert sich der Aufbau des Chromatins in Abhängigkeit von der Temperatur (Kumar und Wigge, 2010). Daher wäre zu klären, inwiefern durch die mögliche temperaturbedingte Funktionsweise von ELF3 die *PIF4*-Expression beeinflusst wird.

Erhöhte Umgebungstemperaturen induzieren die transiente *PIF4*-Expression, welches direkt die Auxinbiosynthese in Pflanzen stimuliert. Es wurden allerdings keine Temperaturphänotypen für die Kotyledonen beobachtet (Abb. 3.19), welche zum einen Ort der *PIF4*-Expression (Stavang *et al.*, 2009) und zum anderen auch Ort der Auxinbiosynthese sind (Ljung *et al.*, 2001; Avsian-Kretchmer *et al.*, 2002). Indes führt die erhöhte intrazelluläre Auxinkonzentration dann zum gesteigerten Längenwachstum der Hypokotyle. Um diese Situation für den *GIR2*-Locus nachzustellen und dessen Abhängigkeit der phänotypischen Ausprägung von Auxin zu zeigen, wurden verschiedene dieser exogen appliziert und das Hypokotyl- sowie das Wurzelwachstum bestimmt (Abb. 3.17 und A.17). Allerdings führte die exogene Applikation von Auxin nur partiell zu unterschiedlichen Reaktionen in den für den *GIR2*-Locus segregierenden HIFs. Die klassischen Auxinreaktionstests konnten keinen klaren Aufschluss über die Beteiligung des Auxins am *GIR2*-vermittelten TIHE-Phänotyp in Bay-0 und Sha erbringen. Es ist allerdings hinreichend bekannt, dass, obwohl auxinüberproduzierende Mutanten ein verlängertes Hypokotyl aufweisen (Romano *et al.*, 1995; Delarue *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001; Savaldi-Goldstein *et al.*, 2008), die exogene Applikation sowohl vom natürlichen Auxin IAA wie auch der synthetischen Auxine 2,4-D und NAA nicht zur Mimikry dieses Phänotyps beitragen (Hanson und Trewavas, 1982). Als Ursache wird häufig die unterschiedliche Effizienz der Aufnahme der einzelnen Auxine spekuliert (Delbarre *et al.*, 1996; Franklin *et al.*, 2011; Hosek *et al.*, 2012).

Hingegen konnte für die Applikation des synthetischen Auxins Picloram ein positiver Einfluss auf das Hypokotylwachstum (Savaldi-Goldstein *et al.*, 2008) wie z. B. in der *pif4*-Mutante verzeichnet werden (Franklin *et al.*, 2011). Daher wäre es interessant zu testen, inwiefern die Applikation von Picloram oder aber vom ebenfalls als Hypokotylwachstumsfaktor bekannten Proauxin 6027864 (Savaldi-Goldstein *et al.*, 2008) den entsprechenden TIHE-Phänotyp in der Akzession Bay-0 verstärken könnte.

Keine unterschiedliche Effizienz in der Aufnahme von radioaktiv markierten IAA konnte zwischen den nah verwandten Spezies *A. thaliana* und *A. lyrata* ermittelt werden (C. Delker und J. Trenner, unpublizierte Daten). Daher ist eine unterschiedliche Auxinaufnahme innerhalb verschiedener *A. thaliana*-Akzessionen eher unwahrscheinlich. Messungen der Auxinkonzentration von Keimlingen der segregierenden HIFs, welche bei 20°C bzw. 28°C angezogen wurden, waren wenig aufschlussreich, aufgrund der starken linienspezifischen Variation innerhalb der Experimente (Daten nicht gezeigt). Hilfreich zur Analyse der Auxinbeteiligung am *GIR2*-vermittelten Phänotyp könnten bspw. Expressionsanalysen temperaturinduzierbarer Gene wie *YUC8*, *SAV3/TAA1* oder der *Aux/IAAs* sein. Außerdem wären Analysen bezüglich der Aktivität des durch Auxin induzierbaren Reporters *DR5* (Gray *et al.*, 1998) in den am *GIR2*-Locus segregierenden Linien der HIF von Interesse. Damit bestünde die Möglichkeit, temperaturabhängige Unterschiede im Auxinsignalweg zu visualisieren und deren Kinetik zu detektieren.

Neben Auxin reguliert PIF4 auch weitere Phytohormonwege wie bspw. GA (Abb. 4.4). So interagiert PIF4 mit den DELLA-Proteinen GIBBERELIC ACID INSENSITIVE (GAI) und REPRESSOR OF GA (RGA). Beide Proteine kontrollieren vorrangig das Hypokotyl- und Sprossachsenwachstum (Peng *et al.*, 1997; Dill *et al.*, 2001; King *et al.*, 2001). Daher wurde die Abhängigkeit des *GIR2*-vermittelten TIHE-Phänotyps von der Funktionsweise des PIF4-Proteins durch weitere klassische Hormonreaktionstests analysiert. Der Einfluss des Phytohormons GA auf das unterschiedliche Hypokotylwachstum der für den *GIR2*-Locus segregierenden Linien war nicht eindeutig (Abb. A.18). Allerdings zeigten genetische Studien, dass die Aktivität des GA-Weges notwendig ist, um das Hypokotylwachstum bei erhöhten Umgebungstemperaturen zu fördern. Es ist allerdings nicht zwangsläufig suffizient für den TIHE-Phänotyp, da die *DELLA*-Pentuplemutante weiterhin partiell einen TIHE-Phänotyp aufweist (Koini *et al.*, 2009; Stavang *et al.*, 2009). Außerdem ist für die *DELLA*-Pentuplemutante trotz aktiven GA-Signalweges kein Hypokotylwachstum durch Inhibition des polaren Auxintransportes (NPA-Applikation) bzw. der Brassinosteroidbiosynthese (Brassinazolapplikation) zu verzeichnen (Stavang *et al.*, 2009). Daher scheint für die Ausprägung des TIHE-Phänotyps auch ein GA-unabhängiger Weg



zu existieren, welcher zumindest den polaren Auxintransport und wahrscheinlich nachgeschaltet die Brassinosteroidbiosynthese benötigt.

Dieser GA-unabhängige Weg könnte im Fall der *GIR2*-Region für eine Rolle bei der Ausprägung des TIHE-Phänotyps sprechen. Jedoch führten exogene Applikationsexperimente mit 24-epi-BL (Abb. A.20), dem biologisch aktivsten Brassinosteroid (Clouse *et al.*, 1993), zu keinen phänotypischen Unterschieden in den für den *GIR2*-Locus segregierende Linien der HIFs. Mutanten des BR-Signalweges (permanente Aktivierung der Brassinosteroidreaktion) zeigten zwar einen hypersensitiven TIHE-Phänotyp im Vergleich zur Wildtypkontrolle, allerdings war die Reaktion ähnlich bei gleichzeitiger Applikation von NPA (Stavang *et al.*, 2009). Weiterhin sind für die Regulation des Hypokotylwachstums beide Hormonwege essentiell, wobei die Brassinosteroidreaktion vorrangig vom polaren Auxintransport abhängig ist (Nemhauser *et al.*, 2004; Vert *et al.*, 2008). Daher scheint der polare Auxintransport essentiell für die Ausprägung des TIHE-Phänotyps zu sein. Damit könnte er bzw. der durch ihn etablierte Auxingradient als mögliche Ursache für die Reaktionsunterschiede des *GIR2*-vermittelten TIHE-Phänotyps in Betracht gezogen werden. Entsprechende Messungen in Hypokotylsegmenten mit radioaktiv markierter IAA müssten in den für *GIR2*-segregierenden Linien der HIFs bzw. als Kontrolle in den Akzessionen Bay-0 und Sha durchgeführt werden. Es bleibt allerdings auch zu testen, inwiefern die Hemmung der Brassinosteroidbiosynthese einen Einfluss auf den *GIR2*-vermittelten Phänotyp hat. Introgression des *DR5*-Reporters wäre weniger sinnvoll, da dieser sowohl sensibel gegenüber Auxin als auch Brassinosteroiden ist (Nakamura *et al.*, 2003; Nemhauser *et al.*, 2004).

Obwohl GA<sub>3</sub> selbst keinen Einfluss auf die phänotypische Ausprägungen des *GIR2*-vermittelten TIHE-Phänotyps zu haben scheint (Abb. A.18), führte die exogene Applikation des GA-Biosynthesehemmers PAC zu Reaktionsunterschieden in den segregierenden Linien der HIFs (Abb. 3.18). Daher spielt vermutlich die Regulation der GA-Biosynthese eher im *GIR2*-vermittelten Hypokotylwachstum eine Rolle als der GA-Signalweg. Dies wird weiterhin durch die Tatsache unterstützt, dass die exogene Inhibition der GA-Biosynthese die Ausprägung des TIHE-Phänotyps mindert (Koini *et al.*, 2009; Stavang *et al.*, 2009). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einen brassinosteroidunabhängigen Weg, da die PAC-Applikation zur Aufhebung des TIHE-Phänotyps in der Triplemutante des Brassinosteroidsignalweges (permanente Aktivierung des BR-Signalweges) führt (Stavang *et al.*, 2009). Hinzu kommt, dass ein Temperaturanstieg auf 29°C zur Induktion der Expression diverser Gene im Hypokotyl führt, deren Produkte einer Funktion im GA-Metabolismus wie bspw. *GA20ox1* und *GA3ox1* nachkommen. Im Vergleich dazu sinkt die Expressionsrate dramatisch für *GA20ox1*, dessen Produkt zur Inaktivierung von GA führt (Stavang *et al.*, 2009).

Demnach ist es gut möglich, dass der GA-Metabolismus in der Ausprägung des *GIR2*-vermittelten TIHE-Phänotyps der Akzessionen Bay-0 und Sha eine Rolle spielt. Daher ist eine komplexe Regulation diverser hormoneller Wege durch den *GIR2*-Locus anzunehmen, was zu einem unterschiedlich starken Hypokotylwachstum führt.

Dass *PIF4* selbst ein Kandidatengenes des *GIR2*-Locus darstellt, ist auszuschließen, da es sich außerhalb des *GIR2*-Intervalls befindet. Aufgrund der Regulation der *PIF4*-Expression durch veränderte Temperaturen (Koini *et al.*, 2009; Stavang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012) und durch *ELF3* (Nusinow *et al.*, 2011; Nomoto *et al.*, 2013), das potentielle Kandidatengenes des *GIR2.1*-Locus, ist eine Beteiligung an der Ausprägung des *GIR2*-vermittelten Phänotyps sehr wahrscheinlich. Hierbei handelt es sich aber, wenn überhaupt, um sekundäre Effekte, wie die phänotypischen Analysen der am *GIR2*-Locus segregierenden HIFs bereits andeuten. Demnach scheinen die hier analysierten, bekannten *downstream*-Reaktionen des TIHE-Phänotyps einer komplexen, sowohl *GIR2*-abhängigen als auch -unabhängigen Regulation zu unterliegen. Allen voran ist daher die zentrale Fragestellung zu klären, ob *ELF3* das kausale Gen des *GIR2.1*-Locus darstellt und wenn dem so ist, wie die exakten mechanistischen Details durch thermale Veränderungen in Bay-0 und Sha erfolgen. Mit der natürlichen Variation als Ressource kann dies einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der pflanzlichen Entwicklung auf erhöhte Umgebungstemperaturen darstellen.

## 5 Zusammenfassung

Eine Vielzahl von Merkmalen unterliegt einer natürlichen genetischen Variation. Diese weisen in der Regel einen konkreten Adaptationsbezug auf. Hingegen war bisher unbekannt, ob konservativ regulierte Prozesse wie z. B. die Auxinbiologie einer ähnlichen adaptionspezifischen Plastizität unterliegen. Mittels genetisch diverser *A. thaliana*-Akzessionen konnte die natürliche Variation für diverse Auxinphänotypen in Keimlingen ermittelt werden, die einer oligogenen Vererbung zu unterliegen scheinen. QTL-Kartierungen der Auxinphänotypen mittels der Bay-0 x Sha RIL-Population bestätigten, dass es sich um eine Vielzahl von Loci mit eher geringfügigen Effekten handelt. Trotzdem konnten einige dieser Loci mittels HIFs erfolgreich validiert werden. Aufgrund des geringen Anteils an der Merkmalsausprägung und deren komplexe Regulation, war die Identifikation der kausalen Gene jedoch nicht möglich. Eine Ausnahme stellt die temperaturinduzierte Hypokotyl-elongation (TIHE) dar. Für diesen klassischen auxinassozierten Phänotyp wurde eine sehr starke QTL-Region (*GIRAFFE 2*) auf Chromosom 2 identifiziert. Diese Region ist verantwortlich für die unterschiedlich starke Ausprägung der TIHE-Reaktion in Bay-0 und Sha und konnte erfolgreich validiert werden. Die weitere Feinkartierung führte zur Identifikation von zwei verantwortlichen Loci (*GIR2.1* und *GIR2.2*) innerhalb der *GIR2*-Region, deren Präsenz zur Entstehung eines sogenannten *ghost*-QTLs führt. Im Rahmen dieser Arbeit war eine eindeutige, genetische Trennung der dem *ghost*-QTL zu Grunde liegenden Regionen *GIR2.1* und *GIR2.2* möglich. Damit ist die Basis für eine der seltenen Möglichkeiten gelegt worden, nicht nur die Existenz eines *ghost*-QTLs zu zeigen, sondern dessen kausale Gene auch genetisch zu trennen und zu klonieren. Für *GIR2.1* repräsentiert *ELF3* einen potentiellen Kandidaten, welcher als Kernkomponente der circadianen Rhythmik u. a. auch in diverse temperaturinduzierte Wachstumsprozesse involviert ist. Analysen der Parentalakzession der RIL-Population, Bay-0 und Sha, ergaben die Identifikationen eines SNPs sowie eines InDels in der kodierenden Sequenz, welche als Ursache der beobachteten phänotypischen Varianz in Betracht kommen. Obwohl die Komplementationsanalyse mit den entsprechenden chimären Konstrukten noch aussteht, sprechen die Daten für *ELF3* als potentielles Kandidatengen des *GIR2.1*-Locus.

## 6 Anhang

**Tab. A.1: Verwendete Wildtypakzessionen**

Angegeben ist jeweils der Name der verwendeten Akzessionen, deren Identifikationsnummer und Herkunft. Zusätzliche Informationen finden sich unter <http://dbsgap.versailles.inra.fr> und <http://arabidopsis.info/>.

Name der Akzession	Identifikationsnummer	Herkunft
Bay-0	CS/N22676	Bayreuth, Deutschland
Bay-0 (RIL-Elter)	CS/N057923	Bayreuth, Deutschland
Bor-4	CS/N22677	Borky, Tschechische Republik
Br-0	CS/N22678	Brünn, Tschechische Republik
Bur-0	CS/N22679	Burren, Irland
C24	CS/N22680	Coimbra, Portugal
Col-0	CS/N22681	Landsberg (Warthe), Polen
Cvi-0	CS/N22682	Kapverdische Inseln, Kap Verde
Est-1	CS/N22683	Pinska, Estland
Fei-0	CS/N22684	St. Maria da Feira, Portugal
Got-7	CS/N22685	Göttingen, Deutschland
Jea	25 AV	St. Jean Cap Ferrat, Frankreich
Ler-0	NW20	Landsberg (Warthe), Polen
Ler-1	CS/N22686	Landsberg (Warthe), Polen
Lov-5	CS/N22695	Lövvik, Schweden
Nfa-8	CS/N22687	Ascot, Großbritannien
Pi-0	CS/N1454, 40 AV	Pitztal, Österreich
Ran	21 AV	Cale de Mordreuc, Frankreich
Rrs-7	CS/N22688	North Liberty, USA
Rrs-10	CS/N22689	North Liberty, USA
S96	CS/N914, 232 AV	Niederlande
Sav-0	CS/N1514, 235 AV	Slavice, Tschechische Republik
Sap-0	CS/N1506, 234 AV	Slapy, Tschechische Republik
Sha (Shakdara)	CS/N22690	Pamiro-Alay, Tadschikistan
Sha (RIL-Elter)	CS/N057924	Pamiro-Alay, Tadschikistan
Tamm-2	CS/N22691	Tammisari, Finnland
Ts-1	CS/N22692	Tossa de Mar, Spanien
Tsu-1	CS/N22693	Tsushima, Japan
Van-0	CS/N22694	Vancouver, Kanada

**Tab. A.2: Akzessionen der Kreuzungsanalysen**

Angegeben ist jeweils der Name der zur Kreuzung verwendeten parental Akzessionen, deren Identifikationsnummer und Herkunft.

Name der Akzession	Identifikationsnummer	Herkunft
Bay-0	CS/N954, 41 AV	Bayreuth, Deutschland
C24	CS/N906, 183 AV	Coimbra, Portugal
Col-0	CS/N1092, 186 AV	Landsberg (Warthe), Polen
Sha	CS/N929, 236 AV	Pamiro-Alay, Tadschikistan
Tsu-1	CS/N1640, 239 AV	Tsushima, Japan

**Tab. A.3: Verwendete HIFs**

Angegeben ist jeweils der Name der verwendeten HIF, Lage des segregierenden Intervalls und der zu validierenden QTL-Region. Zusätzlich ist die Quelle der HIF angegeben.

HIF	segregierende Intervalle		QTL-Region	Quelle
	Chr.	Intervall		
40	4	<i>MSAT4.68 - MSAT4.37</i>	<i>W2,4-D4.2</i>	Becker (2011)
61	2	<i>MSAT2.36</i>	<i>GIR2</i>	C. Camilleri (INRA)
71	1	<i>MSAT1.10 - MSAT108193</i>	<i>GIR1</i>	C. Camilleri (INRA)
84	2	<i>MSAT2.41 - MSAT2.7</i>	<i>GIR2</i>	C. Camilleri (INRA)
	3	<i>MSAT3.65</i>		
130	5	<i>NGA225 - MSAT512110</i>	<i>H2,4-D5, HIAA5</i>	diese Arbeit
	5	<i>MSAT5.9 - MSAT518662</i>		
155	4	<i>MSAT4.9 - MSAT4.68</i>	<i>W2,4-D4.2</i>	Becker (2011)
163	2	<i>MSAT2.41 - MSAT2.7</i>	<i>GIR2</i>	C. Camilleri (INRA)
194	1	<i>IND6375 - IND1136</i>	<i>GIR1</i>	C. Camilleri (INRA)
	4	<i>MSAT4.43</i>		
214	5	<i>NGA151 - NGA139</i>	<i>GIR5</i>	C. Camilleri (INRA)
216	5	<i>NGA249</i>	<i>GIR5</i>	C. Camilleri (INRA)
225	2	<i>IND216199 - MSAT2.10</i>	<i>WIAA2</i>	C. Camilleri (INRA)
244	3	<i>MSAT3.21 - MSAT3.18</i>	<i>W2,4-D3</i>	C. Camilleri (INRA)
299	2	<i>MAST2.10 - MSAT2.22</i>	<i>WIAA2</i>	C. Camilleri (INRA)
353	1	<i>IND4992</i>	<i>W2,4-D3</i>	C. Camilleri (INRA)
	3	<i>MSAT3.65 - MSAT3.18</i>		
397	1	<i>MSAT108193 - IND1136</i>	<i>GIR1</i>	C. Camilleri (INRA)
	5	<i>MSAT518662</i>		
400	5	<i>MSAT5.14 - NGA139</i>	<i>GIR5</i>	C. Camilleri (INRA)
	5	<i>MSAT5.22 - MSAT5.59</i>		

Tab. A.4: Verwendete Oligonukleotide

Angegeben ist jeweils der Name der verwendeten Oligonukleotide und die Sequenz in entsprechender 5'->3'-Orientierung. Die physikalische Position der zu amplifizierenden SNPs bzw. InDels ist als Referenz auf Col-0 (TAIR10.0, <http://arabidopsis.org/>) bezogen. Dies gilt nur für Oligonukleotide, welche in der vorliegenden Arbeit generiert wurden. Bei CAPS-Markern ist zusätzlich das Restriktionsenzym für die sich anschließende Restriktionsspaltung angegeben. Mit u. sind unbekannte Fragmentgrößen gekennzeichnet. Fortsetzung siehe Seite 101 und 102

Chromosom	Name	Sequenz 5' -> 3'	Position SNP/InDel [Bp]	Enzym	Fragmentgröße [Bp]		Quelle
					Bay-0	Sha	
	MSAT2.36 F	CCAAGAAGCTCAAAAACCGTT	8.678.597	-	u.	u.	Loudet <i>et al.</i> (2002)
	MSAT2.36 R	GATCTGCCTCTTGATCAGC					
	CAPSII-At2g21470 F	CTCTAGGAGGACTCTCTGTTTAG	9.199.751	BseGI	532, 322	854	diese Arbeit
	CAPSII-At2g21470 R	TTGGCGTGCTGGTTATTGTA					
	CAPSII-At2g24010 F	CACAGGTGGGAAATGGAGAT	10.217.046	Avall	379, 474	853	diese Arbeit
	CAPSII-At2g24010 R	CGCCAAGAAGCATCTTAAA					
	CAPSII-At2g25355 F	CCTTGGACCCCTCTGAATCAA	10.802.988	Kpn2I	159, 751	910	diese Arbeit
	CAPSII-At2g25355 R	CTGCAGCCTTCCACCTTCT					
	CAPSII-At2g25660 F	TTCCGTGAGAGATCGTGTG	10.917.542	Bsp119I	867	600, 267	diese Arbeit
	CAPSII-At2g25660 R	GGCAGACTTTGAACCCCTAA					
	ELF3 SSLIP F	CGTCAACAAAAGGGTGACT	11.062.740	-	617	593	diese Arbeit
	ELF3 SSLIP R	TTGCTCGCGGATAAGACTTT					
	MSAT2.41 F	ACAAACCATTTGTTGGTCGTG	11.095.452	-	u.	u.	Loudet <i>et al.</i> (2002)
	MSAT2.41 R	GACTGTTTCATCGGATCCAT					
	CAPSII-At2g26080 F	TCTGGATCGGCTTTTACCAC	11.113.239	BseRI	885	448, 437	diese Arbeit
	CAPSII-At2g26080 R	CATCGGAACACCAAAACCTCT					
	CAPSII-At2g26380 F	CGTGATCTTCTCCGGTGTT	11.227.382	HindIII	632, 275	907	diese Arbeit
	CAPSII-At2g26380 R	CAAAACAGGGAATGGATTGG					
	CAPSII-At2g27060 F	TGGGAATATTTGTGGCAGGT	11.552.556	XhoI	264, 440	704	diese Arbeit
	CAPSII-At2g27060 R	TGGATGAAACGCTGAATCTG					

Tab. A.4: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung)

Chromosom	Name	Sequenz 5' -> 3'	Position SNP/InDel [Bp]	Enzym	Fragmentgröße [Bp]		Quelle
					Bay-0	Sha	
	CAPSII-At2g27610 F	TGTGGGAATGTAGGAAAGC	11.785.547	<i>Bgl</i> II	553, 381	934	diese Arbeit
	CAPSII-At2g27610 R	AGACTTCTCCGCACTCTCG					
	CZSOD2 F	GAATCTCAATATGTGCAAC	11.951.653	-	u.	u.	Loudet <i>et al.</i> (2002)
	CZSOD2 R	GCATTACTCCGGTGTCTGC					
	CAPSII-At2g28350 F	TCGTCTCCGTGAAGTTCCTC	12.114.807	<i>Eco</i> RV	851	302, 549	diese Arbeit
	CAPSII-At2g28350 R	GGCGGAGACAGTACCCATAA					
	CAPSII-At2g28580 F	CAGTTCTGGGGAGATGTTT	12.246.823	<i>Nsb</i> I	307, 546	853	diese Arbeit
	CAPSII-At2g28580 R	AGGGCATAAGGGAGTTGGTT					
	CAPSII-At2g29990 F	GCGAGGGATTGTGAAAAGATG	12.794.288	<i>Bse</i> MI	521, 330	851	diese Arbeit
	CAPSII-At2g29990 R	TGTCACGACCAAAAACGAAA					
	CAPSII-At2g30490 F	TTTTTGGTCTCCCTGAAGA	12.994.355	<i>Aat</i> II	487, 405	892	diese Arbeit
	CAPSII-At2g30490 R	TGGTCCAAGTCCAACAATCA					
	CAPSII-At2g30600 F	CGGCGAAAAGAGAAACAAGTTT	13.037.942	<i>Bse</i> RI	541, 311	852	diese Arbeit
	CAPSII-At2g30660 R	CCAGGCAAAAAGGACAATTA					
	MSAT2.7 F	CTCAAATCAAGAACGGCTGAC	13.192.607	-	u.	u.	Loudet <i>et al.</i> (2002)
	MSAT2.7 R	CCCGATATAGACAACGACAA					
	IND216199 F	TGGCTCAITTCACACTCACAGG	16.199.330	-	u.	u.	Loudet <i>et al.</i> (2002)
	IND216199 R	GGCTATCTATGGCCGTTATGA					

2

Tab. A.4: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung)

Chromosom	Name	Sequenz 5' -> 3'	Position SNP/InDel [Bp]	Enzym	Fragmentgröße [Bp]		Quelle
					Bay-0	Sha	
4	MSAT4.43 F	GCATTGGACCATAAGGG	2.575.724	-	u.	u.	Loudet <i>et al.</i> (2002)
	MSAT4.43 R	TCAAGACGGTTTCAAGTTG					
	CAPSV-At4g32670 F	ACAGGTTCTTGCCATCAACA	15.761.503	<i>BpiI</i>	865	252, 613	Becker (2011)
	CAPSV-At4g32670 R	ACCGGGACCGAATATTACT					
	CAPSV-At4g38980 F	ATCCATCCCGAGATGTTGT	18.167.203	<i>XhoI</i>	368, 483	851	Becker (2011)
	CAPSV-At4g38980 R	TCGTCATCATTGCACAACAG					
	CAPSV-At5g15380 F	TGTGGGAGAGATCACGAATG	4.992.731	<i>BseNI</i>	867	656, 211	diese Arbeit
	CAPSV-At5g15380 R	TCGATTGATCACAGCCCTACT					
	CAPSV-At5g27930 F	TCCCTGAAAAAGCAAAAAGAGA	9.959.998	<i>KspAI</i>	932	636, 296	diese Arbeit
	CAPSV-At5g27930 R	AAGCGACAAAAGGCATTGAGT					
CAPSV-At5g42490 F	CTCCCACAAAACCGAAAGA	16.989.188	<i>PaeI</i>	879	377, 502	diese Arbeit	
CAPSV-At5g42490 R	GGTAACAAGCTGAGGCCAAA						
5	MSAT518662 F	GCTCCAAAACCCCAACAGGTA	18.662.765	-	u.	u.	Loudet <i>et al.</i> (2002)
	MSAT518662 R	TGGCCTCAAAGCTACCCCTTA					



## Zweifaktorielle ANOVA der 2,4-D-vermittelten Inhibition des Primärwurzelwachstums

	Bay-0	Bor-4	Br-0	Bur-0	C24	Col-0	Cvi-0	Est-1	Fei-0	Got-7	Ler-1	Lov-5	Nfa-8	Rrs-7	Rrs-10	Rrs-10	Rrs-7	Nfa-8	Lov-5	Ler-1	Got-7	Fei-0	Est-1	Cvi-0	Col-0	C24	Bur-0	Br-0	Bor-4	Bay-0	
Van-0	0	0,034	0	0	0,002	0	0	0	0	0	0,031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tsu-1	0,382	0	0,387	0,113	0	0,012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ts-2	0	0,48	0	0	0,384	0	0,095	0,004	0	0	0,978	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tamm-2	0,004	0	0,003	0,01	0,004	0,123	0,024	0,127	0,87	0,002	0,027	0,515	0,054	0,227	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sha	0	0,028	0	0	0,99	0	0,305	0,008	0	0,397	0,515	0,001	0,203	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Rrs-10	0	0	0	0	0,004	0	0,084	0,646	0,037	0,004	0,104	0,4	0,234	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Rrs-7	0	0,001	0	0	0,172	0	0,715	0,351	0,003	0,071	0,615	0,062	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nfa-8	0	0	0	0	0,001	0,001	0,015	0,178	0,234	0,001	0,026	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lov-5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Ler-1	0	0,015	0	0	0,488	0	0,84	0,151	0,001	0,202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Got-7	0	0,521	0	0	0,384	0	0,102	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fei-0	0	0	0	0	0	0,04	0	0,006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Est-1	0	0	0	0	0,003	0	0,118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cvi-0	0	0,001	0	0	0,255	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Col-0	0,001	0	0,024	0,094	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C24	0	0,014	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bur-0	0,387	0	0,347	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Br-0	0,969	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bor-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bay-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Abb. A.1: Statistische Analyse der 2,4-D-vermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzel von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen**

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition der Primärwurzel durch 2,4-D-Applikation zwischen den Akzessionen der Abb. 3.3A wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ . Mit n. a. markierte Akzessionen wurden nicht analysiert.

## Zweifaktorielle ANOVA der IAA-vermittelten Inhibition des Primärwurzelwachstums

	Bay-0	Bor-4	Br-0	Bur-0	C24	Col-0	Cvi-0	Est-1	Fei-0	Got-7	Ler-1	Lov-5	Nfa-8	Rrs-7	Rrs-10	Rrs-10	Rrs-7	Nfa-8	Lov-5	Ler-1	Got-7	Fei-0	Cvi-0	Col-0	C24	Bur-0	Br-0	Bor-4	Bay-0	Van-0	
Bay-0																														0	
Bor-4																														0	0,199
Br-0																														0	
Bur-0																														0	
C24																														0	
Col-0																														0	
Cvi-0																														0	
Est-1																														0	
Fei-0																														0	
Got-7																														0	0,001
Ler-1																														0	
Lov-5																														0	
Nfa-8																														0	
Rrs-7																														0	
Rrs-10																														0	
Sha																														1	
Tamm-2																														n.a.	
Ts-1																														0	
Tsu-1																														0	
Van-0																														0	

Abb. A.2: Statistische Analyse der IAA-vermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzel von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition der Primärwurzel durch IAA-Applikation zwischen den Akzessionen der Abb. 3.3A wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind (p-Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ . Mit n. a. markierte Akzessionen wurden nicht analysiert.

## Zweifaktorielle ANOVA der NAA-vermittelten Inhibition des Primärwurzelwachstums

	Bay-0	Bor-4	Bor-0	Bur-0	C24	Col-0	Cvi-0	Est-1	Fei-0	Got-7	Ler-1	Lov-5	Nfa-8	Rrs-7	Rrs-10	Rrs-10	Rrs-7	Nfa-8	Lov-5	Ler-1	Got-7	Fei-0	Est-1	Cvi-0	Col-0	C24	Bur-0	Bor-0	Bor-4	Bay-0	
Van-0	0	0,456	1	0,371	0	0,52	n.a.	0,002	0,18	0,24	n.a.	0,74	0	0,634	0,421	0,008	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tsu-1	1	0	0	0	0,03	0	n.a.	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0,002	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ts-2	0,016	0	0	0	0,539	0	n.a.	0	0	0,001	n.a.	0	0	0	0	0,202	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tamm-2	0,011	0	0	0	0,331	0	n.a.	0	0	0,01	n.a.	0	0	0	0,125	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sha	0	0	0,001	0	0	0,002	n.a.	0	0,18	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Rrs-10	0	0,02	0,436	0,011	0	0,04	n.a.	0,011	0,55	0,016	n.a.	0,693	0	0,838	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Rrs-7	0	0,071	0,677	0,043	0	0,119	n.a.	0,006	0,411	0,051	n.a.	0,966	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nfa-8	0,232	0	0	0	0,438	0	n.a.	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lov-5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Ler-1	0	0,122	0,802	0,08	0	0,177	n.a.	0,003	0,307	0,068	n.a.	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Got-7	0	0,483	0,153	0,58	0	0,484	n.a.	0	0,006	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fei-0	0	0,003	0,177	0,005	0	0,014	n.a.	0,203	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Est-1	0	0	0,001	0	0	0	n.a.	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cvi-0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.																									
Col-0	0	1	0,369	0,838	0																										
C24	0,033	0	0	0																											
Bur-0	0	0,861	0,213																												
Bor-0	0	0,291																													
Bor-4	0																														
Bay-0																															

**Abb. A.3: Statistische Analyse der NAA-vermittelten Wachstumsinhibition der Primärwurzel von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen**

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition der Primärwurzel durch NAA-Applikation zwischen den Akzessionen der Abb. 3.3A wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ . Mit n. a. markierte Akzessionen wurden nicht analysiert.

Zweifaktorielle ANOVA der 2,4-D-vermittelten Inhibition des Hypokotylwachstums

	Bay-0	Bor-4	Br-0	Bur-0	C24	Col-0	Cvi-0	Est-1	Fei-0	Got-7	Ler-1	Lov-5	Nfa-8	Rrs-7	Rrs-10	Rrs-10	Rrs-7	Nfa-8	Lov-5	Ler-1	Got-7	Fei-0	Est-1	Cvi-0	Col-0	C24	Bur-0	Br-0	Bor-4	Bay-0
Van-0	0	0	0	0,034	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tsu-1	0	0	0,847	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ts-2	0	0	0,855	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,027	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tamm-2	0,486	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rrs-10	0	0	0,011	0,001	0,004	0	0	0	0	0,006	0,183	0	0,051	0	0,001	0,294	0,014	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rrs-7	0	0	0,921	0	0,515	0	0	0	0,668	0,025	0,011	0	0	0,078	0,003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nfa-8	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0,567	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lov-5	0,001	0,101	0	0	0,144	0	0	0	0,115	0	0,148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ler-1	0	0	0	0,538	0	0	0	0	0	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Got-7	0	0	0	0,046	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fei-0	0,59	0,013	0	0	0,018	0,537	0,533	0,015	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Est-1	0	0,017	0	0	0,001	0	0	0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cvi-0	0	0,781	0	0	0,826	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Col-0	0,918	0	0	0	0	0,938	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C24	0,938	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bur-0	0	0,598	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Br-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bor-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bay-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abb. A.4: Statistische Analyse der 2,4-D-vermittelten Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle durch 2,4-D-Applikation zwischen den Akzessionen der Abb. 3.3B wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind (p-Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ . Mit n. a. markierte Akzessionen wurden nicht analysiert.

Zweifaktorielle ANOVA der IAA-vermittelten Inhibition des Hypokotylwachstums

	Bay-0	Bor-4	Br-0	Bur-0	C24	Col-0	Cvi-0	Est-1	Fei-0	Got-7	Ler-1	Lov-5	Nfa-8	Rrs-7	Rrs-10	Sha	Tamm-2	Ts-2	Tsu-1	Van-0	
Bay-0																					0
Bor-4																					0,005
Br-0																					0,002
Bur-0																					0
C24																					0
Col-0																					0
Cvi-0																					0
Est-1																					0
Fei-0																					0
Got-7																					0,004
Ler-1																					0,267
Lov-5																					0
Nfa-8																					0
Rrs-7																					0,074
Rrs-10																					0,58
Sha																					0
Tamm-2																					0
Ts-1																					0
Tsu-1																					0
Van-0																					0

Abb. A.5: Statistische Analyse der IAA-vermittelten Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle durch IAA-Applikation zwischen den Akzessionen der Abb. 3.3B wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind (p-Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ . Mit n. a. markierte Akzessionen wurden nicht analysiert.

Zweifaktorielle ANOVA der NAA-vermittelten Inhibition des Hypokotylwachstums

	Bay-0	Bor-4	Br-0	Bur-0	C24	Col-0	Cvi-0	Est-1	Fei-0	Got-7	Ler-1	Lov-5	Nfa-8	Rrs-7	Rrs-10	Rrs-10	Rrs-7	Nfa-8	Lov-5	Ler-1	Got-7	Fei-0	Est-1	Cvi-0	Col-0	C24	Bur-0	Br-0	Bor-4	Bay-0		
Van-0	0	0	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Tsu-1	0,003	0,166	0	0,157	0,022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ts-2	0	0,005	0	0,821	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Tamm-2	0	0,002	0	0,552	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Sha	0	0,049	0	0,11	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Rrs-10	0	0	0,833	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Rrs-7	0	0	0	0,96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Nfa-8	0	0,003	0	0,734	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lov-5	0	0,003	0	0,507	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ler-1	0	0	0,599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Got-7	0	0	0,102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fei-0	0	0	0,006	0,009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Est-1	0	0,002	0	0,719	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cvi-0	0,749	0,043	0	0	0,217	0,152																										
Col-0	0,361	0,005	0	0	0,021																											
C24	0,209	0,351	0	0																												
Bur-0	0	0	0																													
Br-0	0	0																														
Bor-4	0,052																															
Bay-0																																
Van-0																																

Abb. A.6: Statistische Analyse der NAA-vermittelten Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle durch NAA-Applikation zwischen den Akzessionen der Abb. 3.3B wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ . Mit n. a. markierte Akzessionen wurden nicht analysiert.

## Zweifaktorielle ANOVA des TIHE-Phänotyps

	Bay-0	Bor-4	Br-0	Bur-0	C24	Col-0	Cvi-0	Est-1	Fei-0	Got-7	Ler-1	Lov-5	Nfa-8	Rrs-7	Rrs-10	Sha	Tamm-2	Ts-2	Tsu-1	Van-0	
Bay-0		0,004	0,012	0	0,029	0,121	0	0,014	0,044	0	0	n. a.	0,804	0	0,614	0,005	0,594	0	0,008	0,385	
Bor-4			0,046	0	0,188	0,324	0,009	0,06	0,12	0	0	n. a.	0,896	0	0,633	0,038	0,683	0	0,053	0,57	
Br-0				0,579	0,093	0,093	0,7	0,523	0	0	0,035	n. a.	0,044	0	0,016	0,553	0,113	0,168	0,391	0,074	
Bur-0					0,003	0	0,062	0,049	0	0,004	0	n. a.	0	0	0	0,044	0,002	0,106	0,008	0	
C24						0,422	0,2	0,614	0	0	0	n. a.	0,12	0	0,032	0,502	0,329	0	0,671	0,27	
Col-0							0,02	0,201	0,001	0	0	n. a.	0,351	0	0,102	0,12	0,658	0	0,181	0,671	
Cvi-0								0,598	0	0	0	n. a.	0,007	0	0,001	0,658	0,05	0,002	0,391	0,016	
Est-1									0	0	0	n. a.	0,06	0	0,016	0,9	0,18	0,003	0,872	0,131	
Fei-0										0	0	n. a.	0,061	0	0,331	0	0,054	0	0	0,009	
Got-7											0	n. a.	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ler-1												n. a.	0	0,004	0	0	0	0,132	0	0	
Lov-5													n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	
Nfa-8														0	0,534	0,035	0,759	0	0,049	0,624	
Rrs-7															0	0	0	0	0	0	
Rrs-10																0,008	0,391	0	0,011	0,25	
Sha																	0,128	0,002	0,749	0,08	
Tamm-2																		0	0	0,903	
Ts-1																			0	0	
Tsu-1																				0,118	
Van-0																					

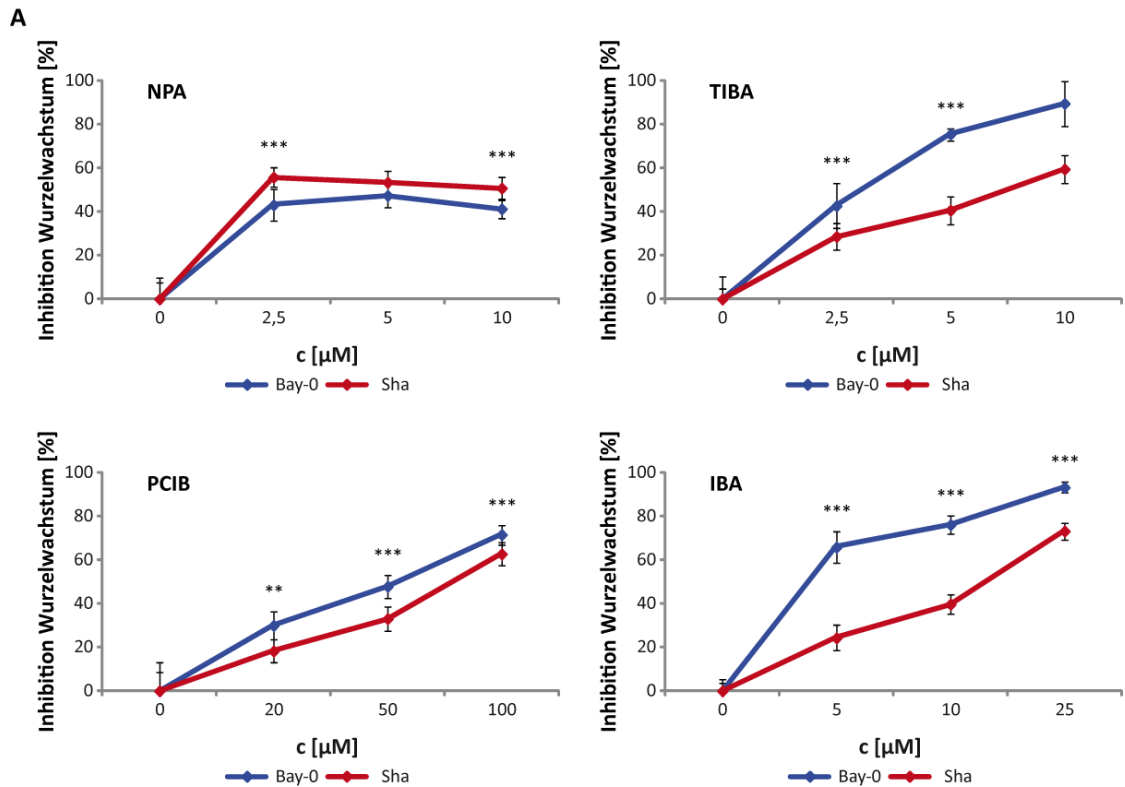
Abb. A.7: Statistische Analyse des TIHE-Phänotyps von 20 resequenzierten *A. thaliana*-Akzessionen

Unterschiede der prozentualen Hypokotylllänge zwischen den Akzessionen der Abb. 3.3C wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ . Mit n. a. markierte Akzessionen wurden nicht analysiert.

Primärwurzelwachstum						Hypokotylwachstum						
2,4-D		IAA		NAA		2,4-D		IAA		NAA		28°C
c [nM]	p-Wert	c [nM]	p-Wert	c [nM]	p-Wert	c [nM]	p-Wert	c [nM]	p-Wert	c [nM]	p-Wert	p-Wert
20	0	50	0	50	0,002	250	0,005	250	0,46	250	0,974	0
30	0	75	0	75	0	375	0,752	375	0,208	375	0,965	
40	0	100	0	100	0	500	0,142	500	0,268	500	0,175	
50	0	150	0	150	0	625	0,002	625	0,396	625	0,736	
60	0					750	0	750	0,002	750	0,871	
70	0					875	0	875	0	875	0,009	
						1000	0	1000	0	1000	0,232	

**Abb. A.8: Statistische Analyse der physiologischen Auxinantworten der Akzessionen Bay-0 und Sha**  
 Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition bzw. Hypokotyllänge zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha der Abb. 3.6 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. Statistisch signifikante Unterschiede sind rot unterlegt (p-Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .



**B**

NPA		TIBA		PCIB		IBA	
c [µM]	p-Wert	c [µM]	p-Wert	c [µM]	p-Wert	c [µM]	p-Wert
5	0	2,5	0	20	0,003	5	0
10	0,02	5	0	50	0	10	0
15	0	10	0,949	100	0	25	0

**Abb. A.9:** Analysen der physiologischen Auxinantworten nach NPA-, TIBA-, PCIB- und IBA-Applikation der *A. thaliana*-Akzessionen Bay-0 und Sha und deren statistische Analyse

(A) Die Bestimmung der prozentualen Inhibition des Primärwurzelswachstums erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen nach drei- (NPA-, TIBA- und PCIB-Applikation) bzw. fünftägiger (IBA-Applikation) Kultivierung. Die prozentualen Wachstumsveränderungen wurden aus den Mittelwerten der Primärwurzellängen behandelter Keimlinge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (n = 15). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Signifikanzen sind der Komplexität halber nur für die HIFs dargestellt (\*\*\*) p-Wert  $\leq 0,001$ , \*\* p-Wert  $\leq 0,01$ ). Die Analysen wurden insgesamt zweimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. (B) Unterschiede der Wachstumsinhibition zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. Statistisch signifikante Unterschiede sind rot unterlegt (p-Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

Tab. A.5: Genetische Interaktionen der identifizierten QTL-Regionen

Behandlung	Interaktion	Epistatische Interaktion				Additive Interaktion					
		Schwellenwert* [cM]	Position 1 [cM]	Position 2 [cM]	LOD-Wert Interaktion	p-Wert	Schwellenwert* [cM]	Position 1 [cM]	Position 2 [cM]	LOD-Wert Interaktion	p-Wert
Wurzelwachstum	W2,4-D3 : W2,4-D4,2		59	56	0,3787	1		58	56	16,2235	0
	W2,4-D3 : W2,4-D5		59	88	0,1642	1		59	88	14,707	0
	W2,4-D4,1 : W2,4-D4,2	3,2659	16	57	0,0803	1	3,8943	16	57	13,4492	0
	W2,4-D4,2 : W2,4-D5		57	74	0,1198	1		57	74	16,8143	0
	WIAA1 : WIAA2		57	46	0,6602	0,9996		58	46	9,8261	0
	WIAA1 : WIAA5	3,2356	64	75	1,159	0,9718	3,9298	63	75	17,6026	0
	WIAA2 : WIAA5		46	75	0,0154	1		46	75	23,9935	0
	WNAA1 : WNAA2		73	48	0,0202	1	3,9219	73	48	6,1919	0,0013
	WNAA2 : WNAA4	3,2186	54	14	0,1553	1		49	13	6,2764	0,001
	H2,4-D1.1 : H2,4-D1.2		1	59	0,0115	1		1	59	7,8037	0
	H2,4-D1.2 : H2,4-D3		43	56	0,0002	1	3,8839	43	56	8,1782	0
	H2,4-D1.2 : H2,4-D5	3,2146	58	22	0,2993	1		42	21	11,6456	0
H2,4-D3 : H2,4-D5		56	22	0,2215	1		56	23	10,2646	0	
Hypokotylwachstum	HIAA1 : HIAA3		2	35	0,04	1		2	35	9,7089	0
	HIAA1 : HIAA5	3,1867	2	19	0,1557	1	3,9313	2	19	14,7268	0
	HIAA3 : HIAA5		35	17	0,601	0,9998		34	18	13,2077	0
	HNAA1 : HNAA5	3,2461	14	17	2,64 10-6	1	3,9271	14	17	5,3426	0,0043
	GIR1 : GIR2		25	36	0,2827	1		25	36	33,93	0
	GIR1 : GIR5	3,2113	25	35	0,0399	1	3,8994	25	35	12,9	0
	GIR2 : GIR5		36	37	0,9446	0,9961		36	44	31,03	0

\* Der 5 %ige Schwellenwert der epistatischen bzw. additiven Interaktion wurde mittels 10000-fachen Permutationstests für jede Behandlung individuell ermittelt. 0 entspricht einem p-Wert von < 0,001

<i>W2,4-D3</i>			c [nM]	<i>W2,4-D4.2</i>		
Bay-0 vs. Sha	244-B vs. 244-S	353-B vs. 353-S		Bay-0 vs. Sha	40-B vs. 40-S	155-B vs. 155-S
0	0	0,001	30	0	0,492	0,69
0	0	0,002	40	0	0,423	0,592
0	0	0	50	0	0,257	0,023

**Abb. A.10: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der QTL-Regionen *W2,4-D3* und *W2,4-D4.2***

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition durch 2,4-D-Applikation zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den einzelnen Linien der HIFs 244 bzw. 353 (Abb. 3.10) und 40 bzw. 155 (Abb. 3.11) wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

<i>WIAA2</i>			
c [nM]	Bay-0 vs. Sha	225-B vs. 225-S	299-B vs. 299-S
50	0	0,293	0,707
75	0	0,974	0,928
100	0,007	0,331	0,156

**Abb. A.11: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der QTL-Region *WIAA2***

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition durch IAA-Applikation zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 225 und 299 der Abb. 3.12 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

<i>H2,4-D5</i>		<i>HIAA5</i>	
Bay-0 vs. Sha	130-B vs. 130-S	Bay-0 vs. Sha	130-B vs. 130-S
0	0,006	0,004	0

**Abb. A.12: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der QTL-Regionen *H2,4-D5* und *HIAA5***

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition durch Applikation von 375 nM 2,4-D und 500 nM IAA zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIF 130 der Abb. 3.13 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

<i>GIR1</i>			
Bay-0 vs. Sha	71-B vs. 71-S	194-B vs. 194-S	397-B vs. 397-S
0	0,003	0	0

**Abb. A.13: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der *GIR1*-Region**

Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 71, 194 und 397 der Abb. 3.14 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

<i>GIR2</i>			
Bay-0 vs. Sha	61-B vs. 61-S	84-B vs. 84-S	163-B vs. 163-S
0	0,731	0	0

**Abb. A.14: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der *GIR2*-Region**

Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 61, 84 und 163 der Abb. 3.15 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem  $p$ -Wert von  $< 0,001$ .

<i>GIR5</i>			
Bay-0 vs. Sha	214-B vs. 214-S	216-B vs. 216-S	400-B vs. 400-S
0	0,268	0,937	0,325

**Abb. A.15: Statistische Analyse der funktionellen Validierung der *GIR5*-Region**

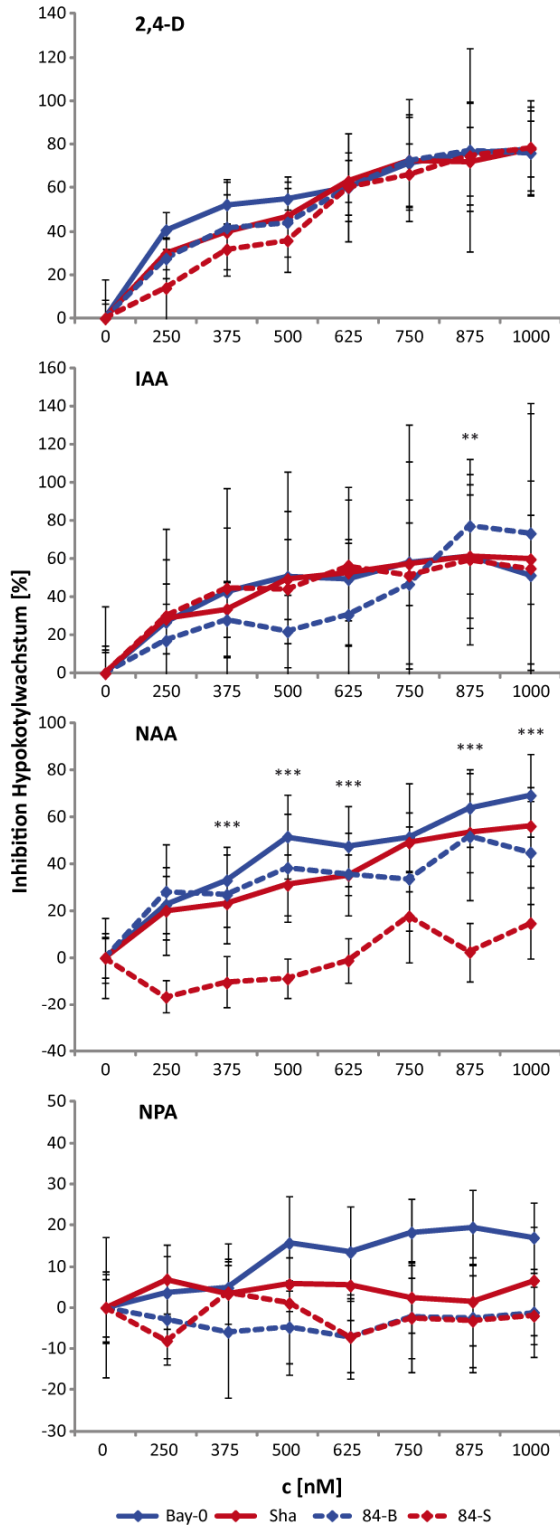
Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 214, 216 und 400 der Abb. 3.16 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem  $p$ -Wert von  $< 0,001$ .

2,4-D	c [nM]	20	30	40	50	60	70
	Bay-0 vs. Sha	0	0	0,055	0	0	0
	84-B vs. 84-S	0	0	0	0,036	0,018	0
	163-B vs. 163-S	0,088	0,458	0	0,009	0,018	0,555
IAA	c [nM]	25	50	75	100	150	
	Bay-0 vs. Sha	0	0	0	0	0	
	84-B vs. 84-S	0	0	0,004	0,009	0,039	
	163-B vs. 163-S	0,383	0,312	0,003	0,002	0,925	
NAA	c [nM]	5	10	50	100	500	
	Bay-0 vs. Sha	0,639	0,008	0,007	0	0	
	84-B vs. 84-S	0,708	0,785	0,356	0,344	0,623	
	163-B vs. 163-S	0,825	0,647	0,919	0,109	0,547	

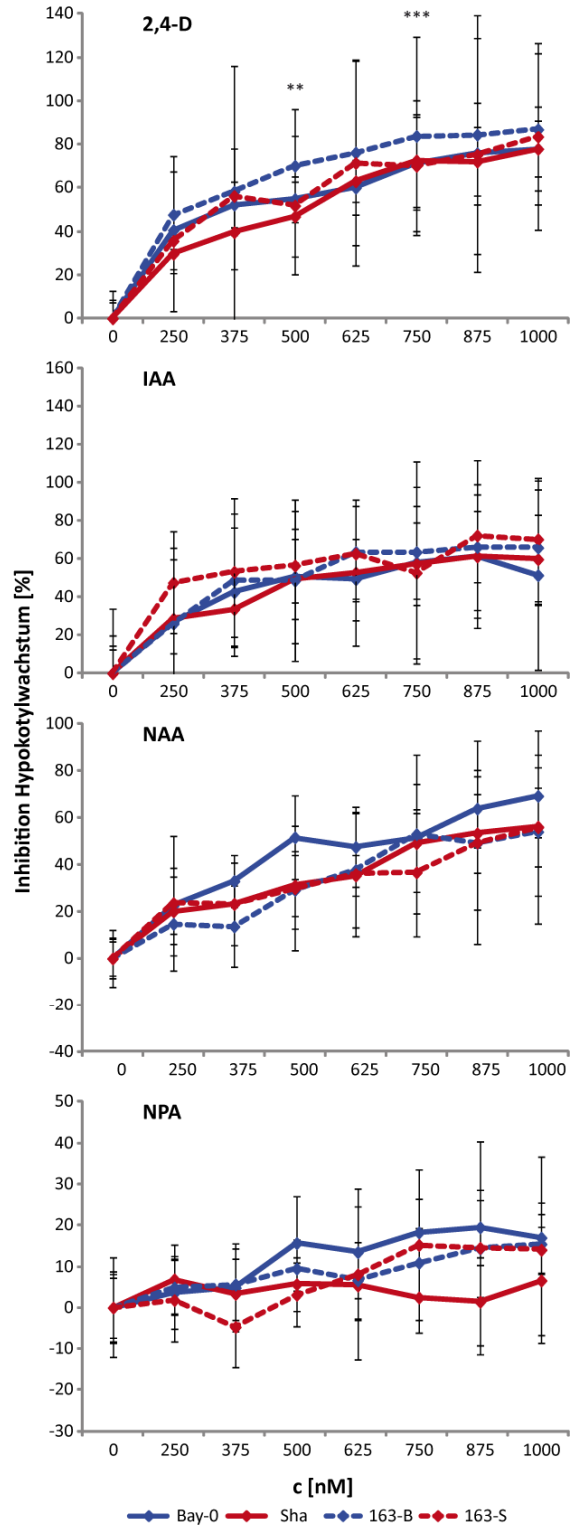
**Abb. A.16: Statistische Analyse der auxinvermittelten Inhibition des Primärwurzelwachstums am *GIR2*-Locus**

Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition durch 2,4-D-, IAA- und NAA-Applikation zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 84 und 163 der Abb. 3.17 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem  $p$ -Wert von  $< 0,001$ .

A



B



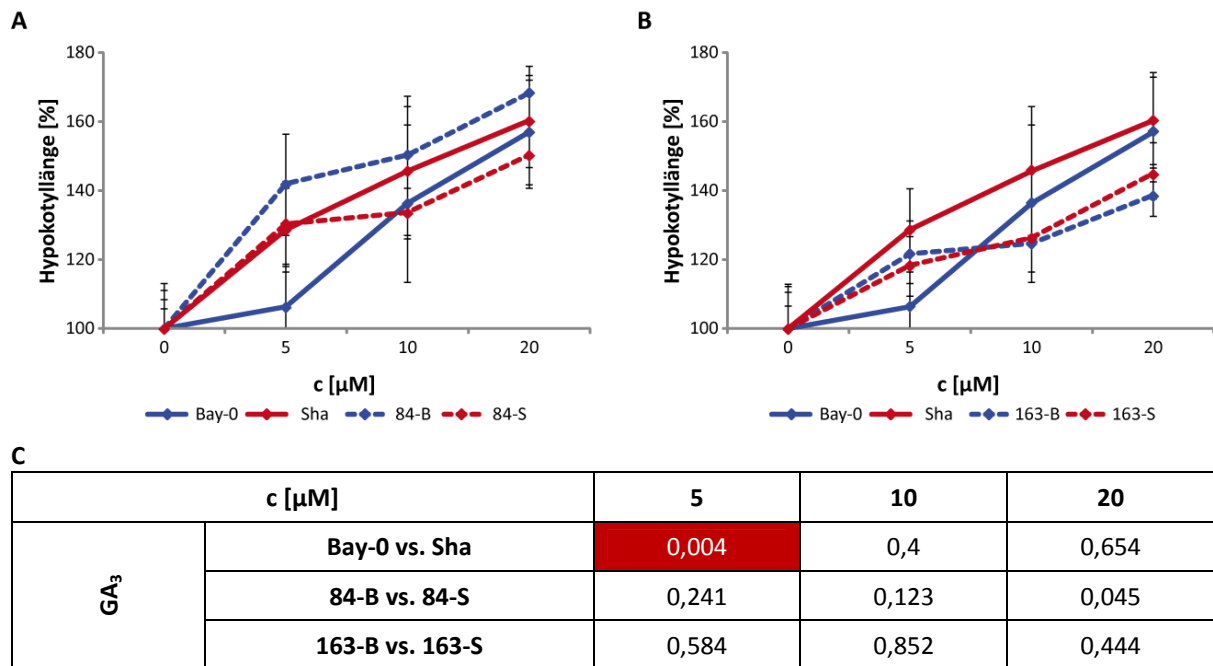
Fortsetzung siehe Seite 116

C

c [nM]		250	375	500	625	750	875	1000
2,4-D	Bay-0 vs. Sha	0,001	0,001	0,03	0,197	0,632	0,092	0,877
	84-B vs. 84-S	0,027	0,061	0,071	0,824	0,024	0,265	0,365
	163-B vs. 163-S	0,347	0,573	0,001	0,491	0	0,026	0,267
IAA	Bay-0 vs. Sha	0,996	0,182	0,974	0,562	0,932	0,972	0,626
	84-B vs. 84-S	0,474	0,182	0,136	0,075	0,932	0,01	0,182
	163-B vs. 163-S	0,28	0,621	0,961	0,953	0,932	0,269	0,628
NAA	Bay-0 vs. Sha	0,777	0,013	0	0,001	0,52	0,001	0
	84-B vs. 84-S	0,091	0	0	0	0,059	0	0
	163-B vs. 163-S	0,174	0,698	0,75	0,893	0,036	0,695	0,501
NPA	Bay-0 vs. Sha	0,665	0,836	0,102	0,295	0,001	0,002	0,102
	84-B vs. 84-S	0,542	0,533	0,628	0,936	0,878	0,85	0,895
	163-B vs. 163-S	0,762	0,316	0,43	0,915	0,565	0,768	0,982

**Abb. A.17: *GIR2*-vermittelte Inhibition des Hypokotylwachstums durch Auxinapplikation und die statistische Analyse**

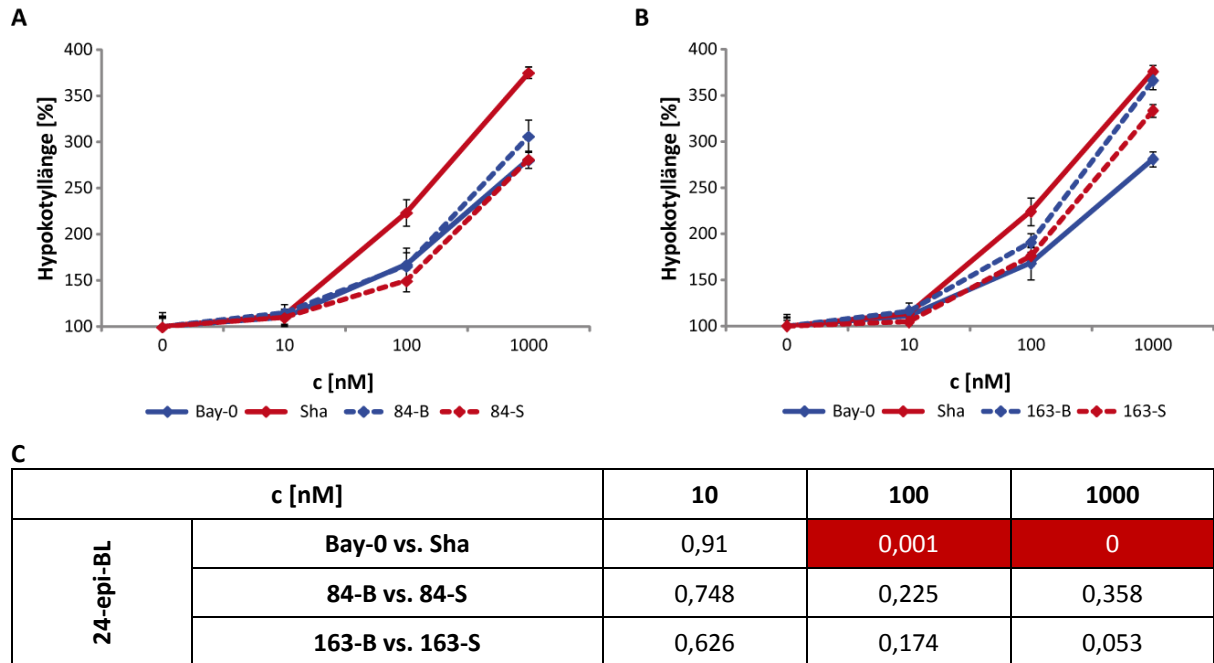
(A) Die Bestimmung der prozentualen Wachstumsinhibition etiolierter Hypokotyle der HIFs 84 und (B) 163 inklusive der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen nach drei- (2,4-D, NAA- und NPA-Applikation) bzw. fünftägiger (IAA-Applikation) Kultivierung. Die prozentualen Wachstumsveränderungen wurden aus den Mittelwerten der Hypokotyllängen behandelter Keimlinge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt ( $n = 30$ ). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Signifikanzen sind der Komplexität halber nur für die HIFs in (A) und (B) dargestellt (\*\* $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , \*\* $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ). Die Analysen wurden insgesamt zweimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. (C) Unterschiede der Wachstumsinhibition zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 84 und 163 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. Statistisch signifikante Unterschiede sind rot unterlegt ( $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem  $p$ -Wert von  $< 0,001$ .



**Abb. A.18: *GIR2*-unabhängige Hypokotylelongation durch GA<sub>3</sub>-Applikation und die statistische Analyse**  
**(A)** Die Bestimmung der prozentualen Hypokotyllänge durch GA<sub>3</sub>-Applikation der HIFs 84 und **(B)** 163 inklusive der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha erfolgte mit zehn Tage alten Keimlingen. Die prozentuale Hypokotyllänge wurde aus den Mittelwerten behandelter Keimlinge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (n = 15). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. Die Analysen wurden insgesamt zweimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt. **(C)** Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 84 und 163 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind (p-Wert ≤ 0,01).

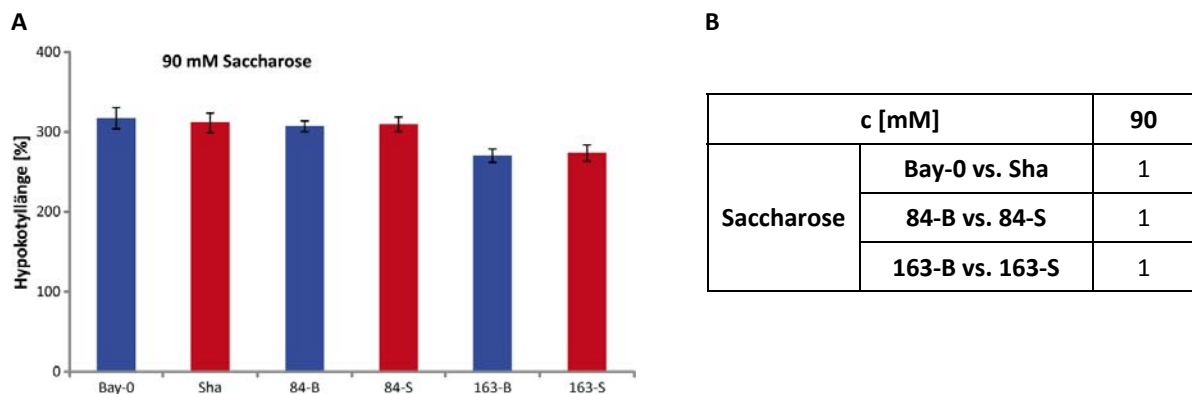
		c [nM]	10	100	500	1000
PAC	20°C	Bay-0 vs. Sha	0,503	0,422	0,408	0,42
		84-B vs. 84-S	0,7	0,284	0,408	0,003
		163-B vs. 163-S	0	0	0	0
	28°C	Bay-0 vs. Sha	0,277	0,559	0,414	0,023
		84-B vs. 84-S	0,004	0	0	0,025
		163-B vs. 163-S	0,494	0	0	0

**Abb. A.19: Statistische Analyse der PAC-vermittelten Inhibition des Hypokotylwachstums am *GIR2*-Locus**  
 Unterschiede der prozentualen Wachstumsinhibition bei 20°C und 28°C durch PAC-Applikation zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 84 und 163 aus der Abb. 3.18 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind (p-Wert < 0,01). 0 entspricht einem p-Wert von ≤ 0,001.



**Abb. A.20: GIR2-unabhängige Hypokotylelongation durch Brassinosteroidapplikation und die statistische Analyse**

(A) Die Bestimmung der prozentualen Hypokotyllänge durch 24-epi-BL-Applikation der HIFs 84 und (B) 163 inklusive der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha erfolgte mit zehn Tage alten Keimlingen. Die prozentuale Hypokotyllänge wurde aus den Mittelwerten behandelter Keimlinge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (n = 15). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. (C) Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 84 und 163 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind (p-Wert ≤ 0,01). 0 entspricht einem p-Wert von < 0,001.



**Abb. A.21: GIR2-unabhängige Elongation etiolierter Hypokotyle durch Saccharoseapplikation und die statistische Analyse**

(A) Die Bestimmung der prozentualen Hypokotyllänge durch Saccharoseapplikation der HIFs 84 und 163 inklusive der Parentalakzessionen Bay-0 und Sha erfolgte mit acht Tage alten Keimlingen. Die prozentuale Hypokotyllänge wurde aus den Mittelwerten behandelter Keimlinge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (n = 17). Die Fehlerbalken stellen die prozentuale Standardabweichung dar. (B) Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 84 und 163 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind (p-Wert ≤ 0,01).



	Kotyledonenstiele	Kotyledonenwinkel
Bay-0 vs. Sha	0,002	0,003
84-B vs. 84-S	1	0,816
163-B vs. 163-S	0,635	0,095

**Abb. A.22: Statistische Analyse temperaturinduzierter Phänotypen der Kotyledonen am *GIR2*-Locus**

Unterschiede der prozentualen Veränderungen zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 84 und 163 der Abb. 3.19 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ).

	Petiolenlänge	Blattfläche
Bay-0 vs. Sha	0,001	0
84-B vs. 84-S	0,001	0,624
163-B vs. 163-S	0	0

**Abb. A.23: Statistische Analyse temperaturinduzierter Phänotypen der Primärblätter am *GIR2*-Locus**

Unterschiede der prozentualen Veränderungen zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha bzw. den Linien der HIFs 84 und 163 aus der Abb. 3.20 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

	TIHE unter DL-Bedingungen	TIHE unter D-Bedingungen
Bay-0 vs. Sha	0,639	0,2
84-B vs. 84-S	0,482	0,4
163-B vs. 163-S	0,617	0,2

**Abb. A.24: Statistische Analyse des Lichteinflusses auf das Hypokotylwachstums am *GIR2*-Locus**

Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge unter Dauerlicht (DL) bzw. im Dunkeln (D) zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha und den Linien der HIFs 84 und 163 aus der Abb. 3.21 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ).

	Blau	Grün	Rot	Dunkelrot
Bay-0 vs. Sha	0	0,001	0	0,992
84-B vs. 84-S	0,992	0,998	1	0,998
163-B vs. 163-S	1	0,999	0,999	0,931
Col-0 vs. <i>elf3-1</i>	0	0,717	0	1

**Abb. A.25: Statistische Analyse des Einflusses der Lichtqualität auf das Hypokotylwachstums am *GIR2*-Locus und für *elf3-1***

Unterschiede des Hypokotylwachstums bei verschiedenen Lichtqualitäten zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha, den Linien der HIFs 84 sowie 163 und *elf3-1* mit dem entsprechenden Wildtyp Col-0 der Abb. 3.22 wurden mittels einfaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p$ -Wert  $\leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

	TIHE
Bay-0 vs. Sha	0,007
84-B vs. 84-S	0
163-B vs. 163-S	0
Col-0 vs. <i>elf3-1</i>	0

**Abb. A.26: Statistische Analyse des TIHE-Phänotyps am *GIR2*-Locus und für *elf3-1***

Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha, den Linien der HIFs 84 sowie 163 und *elf3-1* mit dem entsprechenden Wildtyp Col-0 der Abb. 3.23 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

Bay-0 vs. Sha		
0		
84-B vs. 84-S	F1 vs. 84-B	F1 vs. 84-S
0	0	0,897
163-B vs. 163-S	F1 vs. 163-B	F1 vs. 163-S
0	0	0,98

**Abb. A.27: Statistische Analyse der F1-Generation zum Erstellen der Kartierungspopulation von *GIR2***

Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge zwischen den Akzessionen Bay-0 und Sha, den Linien der HIFs 84 sowie 163 und der aus den Kreuzungen generierten F1-Generationen der Abb. 3.24 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

F4	2638-2	1765-2	2613-3	2806-3	1208-4	1216-3
84-B	0	0	0	0	0	0
84-S	0	0	0	0	0	0

**Abb. A.28: Statistische Analyse der F4-Generation zur phänotypischen Trennung des *GIR2*-Locus**

Unterschiede der prozentualen Hypokotyllänge der F4-Pflanzen im Vergleich zu den parental Linien 84-B und 84-S der Abb. 3.27 wurden mittels zweifaktorieller ANOVA kalkuliert. In der Abb. sind die p-Werte dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede rot unterlegt sind ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). 0 entspricht einem p-Wert von  $< 0,001$ .

## 7 Literaturverzeichnis

- Abel, S., Theologis, A.** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiology*, **111**, 9-17.
- Alonso-Blanco, C., Koornneef, M.** (2000) Naturally occurring variation in Arabidopsis: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science*, **5**, 22-29.
- Alonso-Blanco, C., Aarts, M. G. M., Bentsink, L., Keurentjes, J. J. B., Reymond, M., Vreugdenhil, D., Koornneef, M.** (2009) What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? *The Plant Cell*, **21**, 1877-1896.
- Arends, D., Prins, P., Jansen, R. C., Broman, K. W.** (2010) R/qtl: high-throughput multiple QTL mapping. *Bioinformatics*, **26**, 2990-2992.
- Argyris, J., Truco, M., Ochoa, O., Knapp, S., Still, D., Lenssen, G., Schut, J., Michelmore, R., Bradford, K.** (2005) Quantitative trait loci associated with seed and seedling traits in *Lactuca*. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**, 1365-1376.
- Avsian-Kretchmer, O., Cheng, J.-C., Chen, L., Moctezuma, E., Sung, Z. R.** (2002) Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during Arabidopsis leaf ontogeny. *Plant Physiology*, **130**, 199-209.
- Bailly, A., Sovero, V., Vincenzetti, V., Santelia, D., Bartnik, D., Koenig, B. W., Mancuso, S., Martinoia, E., Geisler, M.** (2008) Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 21817-21826.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., Weigel, D.** (2006) Potent induction of Arabidopsis thaliana flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genetics*, **2**, e106.
- Barbez, E., Kubes, M., Rolcik, J., Beziat, C., Pencik, A., Wang, B., Rosquete, M. R., Zhu, J., Dobrev, P. I., Lee, Y., Zazimalova, E., Petrasek, J., Geisler, M., Friml, J., Kleine-Vehn, J.** (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*, **485**, 119-122.
- Becker, S.** (2011) Quantitative Trait Locus-Analyse von auxin- und temperaturinduzierten Wachstumsveränderungen in Arabidopsis thaliana. Bachelorarbeit.
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B., Feldmann, K. A.** (1996) Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **273**, 948-950.
- Bernacchi, C., Rosenthal, D., Pimentel, C., Long, S., Farquhar, G.** (2009) Modeling the temperature dependence of C3 photosynthesis. In: *Photosynthesis in silico*, Springer (Netherlands), 231-246.
- Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Lee, O. R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B.** (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **19**, 131.
- Blazquez, M. A., Ahn, J. H., Weigel, D.** (2003) A thermosensory pathway controlling flowering time in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, **33**, 168-171.
- Boikoglou, E., Ma, Z., von Korff, M., Davis, A. M., Nagy, F., Davis, S. J.** (2011) Environmental memory from a circadian oscillator: the Arabidopsis thaliana clock differentially integrates perception of photic vs. thermal entrainment. *Genetics*, **189**, 655-664.
- Breton, G., Kay, S. A.** (2007) Plant biology: time for growth. *Nature*, **448**, 265-266.
- Broman, K. W.** (2003) Mapping quantitative trait loci in the case of a spike in the phenotype distribution. *Genetics*, **163**, 1169-1175.
- Broman K. W., Sen S.** (2009) *A guide to QTL mapping with R/qtl*. Springer (USA).

- Calderon-Villalobos, L. I. A., Tan, X., Zheng, N., Estelle, M.** (2010) Auxin perception - structural insights. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**, a005546
- Calderon-Villalobos, L. I. A., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L. B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S., Estelle, M.** (2012) A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology*, **8**, 477-485.
- Carlborg, O., Haley, C.** (2004) Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nature Reviews Genetics*, **5**, 618-625.
- Casal, J. J.** (2012) Shade avoidance. In: *The Arabidopsis Book*, **10**, e0157.
- Chapman, E. J., Estelle, M.** (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics*, **43**, 265-285.
- Cheng, Y., Dai, X., Zhao, Y.** (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes and Development*, **20**, 1790.
- Cho, M., Lee, S. H., Cho, H.-T.** (2007) P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *The Plant Cell*, **19**, 3930-3943.
- Ciesielski, T.** (1872) Untersuchungen über die Abwärtskrümmung der Wurzel. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, **1**, 1-30.
- Clark, R. M., Schweikert, G., Toomajian, C., Ossowski, S., Zeller, G., Shinn, P., Warthmann, N., Hu, T., Fu, G., Hinds, D., Chen, H., Frazer, K., Huson, D., Scholkopf, B., Nordborg, M., Ratsch, G., Ecker, J., Weigel, D.** (2007) Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in Arabidopsis thaliana. *Science*, **317**, 338-342.
- Clouse, S., Hall, A., Langford, M., McMorris, T., Baker, M.** (1993) Physiological and molecular effects of brassinosteroids on Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Growth Regulation*, **12**, 61-66.
- Collett, C. E., Harberd, N. P., Leyser, O.** (2000) Hormonal interactions in the control of Arabidopsis hypocotyl elongation. *Plant Physiology*, **124**, 553-562.
- Coluccio, M. P., Sanchez, S. E., Kasulin, L., Yanovsky, M. J., Botto, J. F.** (2011) Genetic mapping of natural variation in a shade avoidance response: ELF3 is the candidate gene for a QTL in hypocotyl growth regulation. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 167-176.
- Covington, M. F.** (2001) ELF3 modulates resetting of the circadian clock in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **13**, 1305-1315.
- Darwin, C. R., Darwin F. Sir** (1880) *The power of movement in plants*. John Murray (UK).
- Davies, P. J., Mitchell, E. K.** (1972) Transport of indoleacetic acid in intact roots of Phaseolus coccineus. *Planta*, **105**, 139-154.
- Delarue, M., Prinsen, E., Onckelen, H. V., Caboche, M., Bellini, C.** (1998) Sur2 mutations of Arabidopsis thaliana define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *The Plant Journal*, **14**, 603-611.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., Guern, J.** (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, **198**, 532-541.
- Delker, C., Raschke, A., Quint, M.** (2008) Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta*, **227**, 929-941.

- Delker, C., Poeschl, Y., Raschke, A., Ullrich, K., Ettingshausen, S., Hauptmann, V., Grosse, I., Quint, M.** (2010) Natural variation of transcriptional auxin response networks in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, **22**, 2184-2200.
- Desgagne-Penix, I., Sponsel, V. M.** (2008) Expression of gibberellin 20-oxidase1 (AtGA20ox1) in *Arabidopsis* seedlings with altered auxin status is regulated at multiple levels. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2057-2070.
- Diernfellner, A. C. R., Schafmeier, T., Merrow, M. W., Brunner, M.** (2005) Molecular mechanism of temperature sensing by the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Genes and Development*, **19**, 1968-1973.
- Dill, A., Jung, H. S., Sun, T. P.** (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **98**, 14162-14167.
- Ding, Z., Wang, B., Moreno, I., Duplakova, N., Simon, S., Carraro, N., Reemmer, J., Pencik, A., Chen, X., Tejos, R., Skupa, P., Pollmann, S., Mravec, J., Petrasek, J., Zazimalova, E., Honys, D., Rolcik, J., Murphy, A., Orellana, A., Geisler, M., Friml, J.** (2012) ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, **3**, 941.
- Doi, M., Hirayama, J., Sassone-Corsi, P.** (2006) Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*, **125**, 497-508.
- Edwards, K. D., Lynn, J. R., Gyula, P., Nagy, F., Millar, A. J.** (2005) Natural allelic variation in the temperature-compensation mechanisms of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Genetics*, **170**, 387-400.
- Erb, M., Meldau, S., Howe, G. A.** (2012) Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science*, **17**, 250-259.
- Estelle, M. A., Somerville, C.** (1987) Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Molecular and General Genetics*, **206**, 200-206.
- Falconer, D., Mackay, T.** (1996) *Introduction to quantitative genetics*. Addison Wesley Publishing Company (USA).
- Foreman, J., Johansson, H., Hornitschek, P., Josse, E. M., Fankhauser, C., Halliday, K. J.** (2011) Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures. *The Plant Journal*, **65**, 441-452.
- Franklin, K. A., Lee, S. H., Patel, D., Kumar, S. V., Spartz, A. K., Gu, C., Ye, S., Yu, P., Breen, G., Cohen, J. D., Wigge, P. A., Gray, W. M.** (2011) PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **108**, 20231-20235.
- Frigerio, M., Alabadi, D., Perez-Gomez, J., Garcia-Carcel, L., Phillips, A. L., Hedden, P., Blazquez, M. A.** (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **142**, 553-563.
- Gagne, J., Downes, B., Shiu, S., Durski, A., Vierstra, R.** (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **99**, 11519-11524.

- Geisler, M., Blakeslee, J. J., Bouchard, R., Lee, O. R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W. A., Bailly, A., Richards, E. L., Ejendal, K. F., Smith, A. P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Mueller, A., Hrycyna, C. A., Dudler, R., Murphy, A. S., Martinoia, E. (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *The Plant Journal*, **44**, 179-194.
- Geisler, M., Murphy, A. S. (2006) The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters*, **580**, 1094-1102.
- Gibson, S. I. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 93-102.
- Gloeckner, A. (2010) Phänotypische Charakterisierung des *GIRAFFE2* QTLs für temperaturinduzierte Hypokotylverlängerungen in *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit.
- Goldsmith, M. H. M. (1977) The polar transport of auxin. *Annual Review of Plant Physiology*, **28**, 439-478.
- Gray, W. M., Oestin, A., Sandberg, G., Romano, C. P., Estelle, M. (1998) High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**, 7197-7202.
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., Estelle, M. (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, **414**, 271-276.
- Hagen, G., Guilfoyle, T. J. (1985) Rapid induction of selective transcription by auxins. *Molecular and Cellular Biology*, **5**, 1197-1203.
- Hagen, G., Guilfoyle, T. J. (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*, **49**, 373-385.
- Haley, C. S., Knott, S. A. (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, **69**, 315-324.
- Halliday, K. J., Salter, M. G., Thingnaes, E., Whitelam, G. C. (2003) Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *The Plant Journal*, **33**, 875-885.
- Halliday, K. J., Whitelam, G. C. (2003) Changes in photoperiod or temperature alter the functional relationships between phytochromes and reveal roles for phyD and phyE. *Plant Physiology*, **131**, 1913-1920.
- Hamada, F. N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S. R., Ghezzi, A., Jegla, T. J., Garrity, P. A. (2008) An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature*, **454**, 217-220.
- Hanson, J. B., Trewavas, A. J. (1982) Regulation of plant cell growth: the changing perspective. *New Phytologist*, **90**, 1-18.
- Herrero, E., Davis, S. J. (2012) Time for a nuclear meeting: protein trafficking and chromatin dynamics intersect in the plant circadian system. *Molecular Plant*, **5**, 554-565.
- Herrero, E., Kolmos, E., Bujdosó, N., Yuan, Y., Wang, M., Berns, M. C., Uhlworm, H., Coupland, G., Saini, R., Jaskolski, M., Webb, A., Gonçalves, J., Davis, S. J. (2012) EARLY FLOWERING4 recruitment of EARLY FLOWERING3 in the nucleus sustains the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell*, **24**, 428-443.
- Hicks, K., Millar, A., Carre, I., Somers, D., Straume, M. (1996) Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis* early-flowering 3 mutant. *Science*, **274**, 790-792.

- Hicks, K. A., Albertson, T. M., Wagner, D. R. (2001) EARLY FLOWERING3 encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **13**, 1281-1292.
- Hornitschek, P., Kohnen, M. V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., Lopez-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J. M., Solano, R., Trevisan, M., Pradervand, S., Xenarios, I., Fankhauser, C. (2012) Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *The Plant Journal*, **71**, 699-711.
- Hosek, P., Kubes, M., Lankova, M., Dobrev, P. I., Klima, P., Kohoutova, M., Petrasek, J., Hoyerova, K., Jirina, M., Zazimalova, E. (2012) Auxin transport at cellular level: new insights supported by mathematical modelling. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 3815-3827.
- Hull, A. K., Vij, R., Celenza, J. L. (2000) Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**, 2379-2384.
- Huq, E., Quail, P. H. (2002) PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, **21**, 2441-2450.
- Jackson, R. G., Lim, E.-K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D. A., Bowles, D. J. (2001) Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 4350-4356.
- Jansen, R. (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*, **135**, 205-211.
- Jansen, R., Stam, P. (1994) High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, **136**, 1447-1455.
- Jimenez-Gomez, J. M., Wallace, A. D., Maloof, J. N. (2010) Network analysis identifies ELF3 as a QTL for the shade avoidance response in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, **6**, e1001100.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P. (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell*, **110**, 551-561.
- Kai, K., Horita, J., Wakasa, K., Miyagawa, H. (2007) Three oxidative metabolite of indole-3-acetic acid from Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry*, **68**, 1651-1663.
- Kelley, K. B., Lambert, K. N., Hager, A. G., Riechers, D. E. (2004) Quantitative expression analysis of GH3, a gene induced by plant growth regulator herbicides in soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 474-478.
- Keurentjes, J. J. B., Bentsink, L., Alonso-Blanco, C., Hanhart, C. J., Blankestijn-De Vries, H., Effgen, S., Vreugdenhil, D., Koornneef, M. (2007) Development of a near-isogenic line population of Arabidopsis thaliana and comparison of mapping power with a recombinant inbred line population. *Genetics*, **175**, 891-905.
- King, K. E., Moritz, T., Harberd, N. P. (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in Arabidopsis thaliana in the absence of GAI and RGA. *Genetics*, **159**, 767-776.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Swarup, R., Bennett, M., Friml, J. (2006) Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *The Plant Cell*, **18**, 3171-3181.
- Kliebenstein, D. J., West, M. A. L., van Leeuwen, H., Kim, K., Doerge, R. W., Michelmore, R. W., St. Clair, D. A. (2006) Genomic survey of gene expression diversity in Arabidopsis thaliana. *Genetics*, **172**, 1179-1189.
- Koegl, F., Kostermans, D. G. F. R. (1934) Heteroauxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **228**, 113-121.

- Koini, M. A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C. A., Harberd, N. P., Whitelam, G. C., Franklin, K. A.** (2009) High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Current Biology*, **19**, 408-413.
- Kolmos, E., Herrero, E., Bujdoso, N., Millar, A. J., Toth, R., Gyula, P., Nagy, F., Davis, S. J.** (2011) A reduced-function allele reveals that EARLY FLOWERING3 repressive action on the circadian clock is modulated by phytochrome signals in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **23**, 3230-3246.
- Koltai, H.** (2012) Strigolactones activate different hormonal pathways for regulation of root development in response to phosphate growth conditions. *Annals of Botany*, **112**, 409-415.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Vreugdenhil, D.** (2004) Naturally occurring genetic variation in Arabidopsis thaliana. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 141-172.
- Kosambi, D. D.** (1943) The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*, **12**, 172-175.
- Kumar, S. V., Lucyshyn, D., Jaeger, K. E., Alos, E., Alvey, E., Harberd, N. P., Wigge, P. A.** (2012) Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, **484**, 242-245.
- Kumar, S. V., Wigge, P. A.** (2010) H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis. *Cell*, **140**, 136-147.
- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. P. T., Bartel, B.** (2002) Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 20446-20452.
- Leivar, P., Quail, P. H.** (2011) PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science*, **16**, 19-28.
- Leon, P., Sheen, J.** (2003) Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science*, **8**, 110-116.
- Lewis, D. R., Miller, N. D., Splitt, B. L., Wu, G., Spalding, E. P.** (2007) Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporter genes. *The Plant Cell*, **19**, 1838-1850.
- Leyser, H., Lincoln, C., Timppte, C., Lammer, D., Turner, J., Estelle, M.** (1993) Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, **364**, 161-164.
- Leyser, O.** (2006) Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Current Biology*, **16**, R424-R433.
- Lincoln, C., Britton, J., Estelle, M.** (1990) Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis. *The Plant Cell*, **2**, 1071-1080.
- Liu, X. L., Covington, M. F., Fankhauser, C., Chory, J., Wagner, D. R.** (2001) ELF3 encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an Arabidopsis PHYB signal transduction pathway. *The Plant Cell*, **13**, 1293-1304.
- Liu, Z., Zhang, Y., Liu, R., Hao, H., Wang, Z., Bi, Y.** (2011) Phytochrome interacting factors (PIFs) are essential regulators for sucrose-induced hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 1771-1779
- Ljung, K., Bhalerao, R. P., Sandberg, G.** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *The Plant Journal*, **28**, 465-474.
- Ljung, K.** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, **140**, 943-950.



- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P. D., Whitlam, G. C., Fankhauser, C. (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *The Plant Journal*, **53**, 312-323.
- Loudet, O., Chaillou, S., Camilleri, C., Bouchez, D., Daniel-Vedele, F. (2002) Bay-0 × Shahdara recombinant inbred line population: a powerful tool for the genetic dissection of complex traits in Arabidopsis. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 1173-1184.
- Ludwig-Mueller, J. (2000) Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation*, **32**, 219-230.
- Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P., Fink, G. R. (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana. *Genes and Development*, **12**, 2175-2187.
- Maloof, J. N. (2003) Genomic approaches to analyzing natural variation in Arabidopsis thaliana. *Current Opinion in Genetics and Development*, **13**, 576-582.
- Manichaikul, A., Broman, K. W. (2009) Binary trait mapping in experimental crosses with selective genotyping. *Genetics*, **182**, 863-874.
- Mano, Y., Nemoto, K. (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 2853-2872.
- Marchini, J., Donnelly, P., Cardon, L. R. (2005) Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nature Genetics*, **37**, 413-417.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., Mc Steen, P., Zhao, Y., Hayashi, K.-I., Kamiya, Y., Kasahara, H. (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **108**, 18512-18517.
- McClung, C. R., Davis, S. J. (2010) Ambient thermometers in plants: from physiological outputs towards mechanisms of thermal sensing. *Current Biology*, **20**, R1086-R1092.
- McWatters, H. G., Bastow, R. M., Hall, A., Millar, A. J. (2000) The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature*, **408**, 716-720.
- Mikkelsen, M., Hansen, C. H., Wittstock, U., Halkier, B. A. (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 33712-33717.
- Mravec, J., Kubes, M., Bielach, A., Gaykova, V., Petrasek, J., Skupa, P., Chand, S., Benkova, E., Zazimalova, E., Friml, J. (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development*, **135**, 3345-3354.
- Mravec, J., Skupa, P., Bailly, A., Hoyerova, K., Krecek, P., Bielach, A., Petrasek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.-D., Dobrev, P. I., Schwarzerova, K., Rolcik, J., Seifertova, D., Luschnig, C., Benkova, E., Zazimalova, E., Geisler, M., Friml, J. (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, **459**, 1136-1140.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C. J., Glawischnig, E., Olsen, C. E., Halkier, B. A., Glazebrook, J. (2007) Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *The Plant Cell*, **19**, 2039-2052.

- Nakamura, A., Higuchi, K., Goda, H., Fujiwara, M. T., Sawa, S., Koshiba, T., Shimada, Y., Yoshida, S.** (2003) Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiology*, **133**, 1843-1853.
- Neff, M., Neff, J., Chory, J., Pepper, A.** (1998) dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. *The Plant Journal*, **14**, 387-392.
- Nemhauser, J. L., Maloof, J. N., Chory, J.** (2003) Building integrated models of plant growth and development. *Plant Physiology*, **132**, 436-439.
- Nemhauser, J. L., Mockler, T. C., Chory, J.** (2004) Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biology*, **2**, e258.
- Nemhauser, J. L., Hong, F., Chory, J.** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell*, **126**, 467-475.
- Niwa, Y., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2009) The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **50**, 838-854.
- Nomoto, Y., Kubozono, S., Miyachi, M., Yamashino, T., Nakamichi, N., Mizuno, T.** (2012) A circadian clock- and PIF4-mediated double coincidence mechanism is implicated in the thermosensitive photoperiodic control of plant architectures in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **53**, 1965-1973.
- Nomoto, Y., Kubozono, S., Yamashino, T., Nakamichi, N., Mizuno, T.** (2013) Circadian clock- and PIF4-controlled plant growth: a coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **53**, 1950-1964.
- Nordborg, M., Hu, T. T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C., Zheng, H., Bakker, E., Calabrese, P., Gladstone, J., Goyal, R., Jakobsson, M., Kim, S., Morozov, Y., Padhukasahasram, B., Plagnol, V., Rosenberg, N. A., Shah, C., Wall, J. D., Wang, J., Zhao, K., Kalbfleisch, T., Schulz, V., Kreitman, M., Bergelson, J.** (2005) The pattern of polymorphism in Arabidopsis thaliana. *PLoS Biology*, **3**, e196.
- Normanly, J., Grisafi, P., Fink, G. R., Bartel, B.** (1997) Arabidopsis mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene. *The Plant Cell*, **9**, 1781-1790.
- Novak, O., Henykova, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospisil, T., Ljung, K.** (2012) Tissue-specific profiling of the Arabidopsis thaliana auxin metabolome. *The Plant Journal*, **72**, 523-536.
- Nozue, K., Covington, M. F., Duek, P. D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S. L., Maloof, J. N.** (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature*, **448**, 358-361.
- Nozue, K., Harmer, S. L., Maloof, J. N.** (2011) Genomic analysis of circadian clock-, light-, and growth-correlated genes reveals PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR5 as a modulator of auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **156**, 357-372.
- Nusinow, D. A., Helfer, A., Hamilton, E. E., King, J. J., Imaizumi, T., Schultz, T. F., Farre, E. M., Kay, S. A.** (2011) The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, **475**, 398-402.
- Oestin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R. P., Sandberg, G.** (1998) Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **118**, 285-296.

- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., Theologis, A.** (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell*, **17**, 444–463.
- O’Neill, D., Davidson, S., Clarke, V., Yamauchi, Y., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Reid, J., Ross, J.** (2010) Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins. *Planta*, **232**, 1141-1149.
- Park, W. J., Kriechbaumer, V., Mueller, A., Piotrowski, M., Meeley, R. B., Gierl, A., Glawischnig, E.** (2003) The Nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiology*, **133**, 794-802.
- Parry, G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C., Bennett, M. J.** (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. *The Plant Journal*, **25**, 399-406.
- Pazmino, D. M., Romero-Puertas, M. C., Sandalio, L. M.** (2012) Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants. *Plant Signaling and Behavior*, **7**, 425-427.
- Peer, W. A., Blakeslee, J. J., Yang, H., Murphy, A. S.** (2011) Seven things we think we know about auxin transport. *Molecular Plant*, **4**, 487-504.
- Penfield, S.** (2008) Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytologist*, **179**, 615-628.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., Harberd, N. P.** (1997) The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes and Development*, **11**, 3194-3205.
- Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J. J., Abas, M., Seifertova, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanova, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benkova, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O. R., Fink, G. R., Geisler, M., Murphy, A. S., Luschnig, C., Zazimalova, E., Friml, J.** (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, **312**, 914-918.
- Pollard, K. S., Gilbert, H. N., Ge, Y., Taylor, S., Dudoit, S.** (2012) multtest: resampling-based multiple hypothesis testing. R package version 2.12.0.
- Pollmann, S., Mueller, A., Piotrowski, M., Weiler, E. W.** (2002) Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **216**, 155-161.
- Proveniers, M. C. G., van Zanten, M.** (2013) High temperature acclimation through PIF4 signaling. *Trends in Plant Science*, **18**, 59-64.
- Quint, M., Gray, W. M.** (2006) Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 448-453.
- Radwanski, E. R., Last, R. L.** (1995) Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *The Plant Cell*, **7**, 921–934.
- Ramos, J. A., Zenser, N., Leyser, O., Callis, J.** (2001) Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *The Plant Cell*, **13**, 2349-2360.
- Rampey, R. A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G., Bartel, B.** (2004) A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiology*, **135**, 978-988.
- Raven, J.** (1975) Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist*, **74**, 163-172.

- Rawat, R., Schwartz, J., Jones, M. A., Sairanen, I., Cheng, Y., Andersson, C. R., Zhao, Y., Ljung, K., Harmer, S. L.** (2009) REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **106**, 16883-16888.
- Reed, J. W., Nagpal, P., Bastow, R. M., Solomon, K. S., Dowson-Day, M. J., Elumalai, R. P., Millar, A. J.** (2000) Independent action of ELF3 and phyB to control hypocotyl elongation and flowering time. *Plant Physiology*, **122**, 1149-1160.
- Reymond, M., Pieper, B., Barbier, H., Ihnatowicz, A., El-Lithy, M., Vreugdenhil, D., Koornneef, M.** (2007) Genetic and molecular analysis of growth responses to environmental factors using *Arabidopsis thaliana* natural variation. In: *Scale and Complexity in Plant Systems Research: Gene-Plant-Crop Relations*, Springer (Netherlands), 3-13.
- Romano, C. P., Robson, P. R. H., Smith, H., Estelle, M., Klee, H.** (1995) Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: hypocotyl elongation phenotype and interactions with the hy6-1 hypocotyl elongation and axr1 auxin-resistant mutants. *Plant Molecular Biology*, **27**, 1071-1083.
- Rook, F., Hadingham, S. A., Li, Y., Bevan, M. W.** (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell and Environment*, **29**, 426-434.
- Rosenzweig, M., Brennan, K. M., Tayler, T. D., Phelps, P. O., Patapoutian, A., Garrity, P. A.** (2005) The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes and Development*, **19**, 419-424.
- Ross, J. J., Weston, D. E., Davidson, S. E., Reid, J. B.** (2011) Plant hormone interactions: how complex are they? *Physiologia Plantarum*, **141**, 299-309.
- Rubery, P., Sheldrake, A. R.** (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta*, **118**, 101-121.
- Salvi, S., Tuberosa, R.** (2005) To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science*, **10**, 297-304.
- Savaldi-Goldstein, S., Baiga, T. J., Pojer, F., Dabi, T., Butterfield, C., Parry, G., Santner, A., Dharmasiri, N., Tao, Y., Estelle, M., Noel, J. P., Chory, J.** (2008) New auxin analogs with growth-promoting effects in intact plants reveal a chemical strategy to improve hormone delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **105**, 15190-15195.
- Scheel, D., Sandermann, H.** (1981a) Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta*, **152**, 248-252.
- Scheel, D., Sandermann, H.** (1981b) Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta*, **152**, 253-258.
- Seillier-Moisewitsch, F.** (1999) *Selected proceedings of a 1997 joint Ams-Ims-Siam Summer conference on statistics in molecular biology*. Institute for mathematical statistics lecture notes series with the American Mathematical Society (USA).
- Sellaro, R., Pacin, M., Casal, J. J.** (2012) Diurnal dependence of growth responses to shade in *Arabidopsis*: role of hormone, clock, and light signaling. *Molecular Plant*, **5**, 619-628.
- Stasinopoulos, T. C., Hangarter, R. P.** (1990) Preventing photochemistry in culture media by long-pass light filters alters growth of cultured tissues. *Plant Physiology*, **93**, 1365-1369.
- Staswick, P. E., Tiryaki, I., Rowe, M. L.** (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell*, **14**, 1405-1415.

- Stavang, J. A., Gallego-Bartolome, J., Gomez, M. D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J. E., Garcia-Martinez, J. L., Alabadi, D., Blazquez, M. A. (2009) Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **60**, 589-601.
- Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D.-Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Juergens, G., Alonso, J. M. (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, **133**, 177-191.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura T. (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **106**, 5430-5435.
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., Li, C. (2012) PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating Arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS Genetics*, **8**, e1002594.
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Zhai, Q., Li, C. (2013) PIF4 and PIF5 transcription factors link blue light and auxin to regulate the phototropic response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **25**, 2102-2114.
- Sureshkumar, S., Todesco, M., Schneeberger, K., Harilal, R., Balasubramanian, S., Weigel, D. (2009) A genetic defect caused by a triplet repeat expansion in Arabidopsis thaliana. *Science*, **323**, 1060-1063.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G. (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes and Development*, **15**, 2648-2653.
- Tajima, T., Oda, A., Nakagawa, M., Kamada, H., Mizoguchi, T. (2007) Natural variation of polyglutamine repeats of a circadian clock gene ELF3 in Arabidopsis. *Plant Biotechnology*, **24**, 237-240.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I. A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., Zheng, N. (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**, 640-645.
- Tanimoto, E. (2005) Regulation of root growth by plant hormones - roles for auxin and gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **24**, 249-265.
- Tao, Y., Ferrer, J. L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164-176.
- Tataroglu, O., Schafmeier, T. (2010) Of switches and hourglasses: regulation of subcellular traffic in circadian clocks by phosphorylation. *EMBO Reports*, **11**, 927-935.
- Terasaka, K., Blakeslee, J. J., Titapiwatanakun, B., Peer, W. A., Bandyopadhyay, A., Makam, S. N., Lee, O. R., Richards, E. L., Murphy, A. S., Sato, F., Yazaki, K. (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots. *The Plant Cell*, **17**, 2922-2939.
- Tian, Q., Nagpal, P. and Reed, J.W. (2003) Regulation of Arabidopsis SHY2/IAA3 protein turnover. *The Plant Journal*, **36**, 643-651.
- Todesco, M., Balasubramanian, S., Hu, T. T., Traw, M. B., Horton, M., Epple, P., Kuhns, C., Sureshkumar, S., Schwartz, C., Lanz, C., Laitinen, R. A. E., Huang, Y., Chory, J., Lipka, V., Borevitz, J. O., Dangel, J. L., Bergelson, J., Nordborg, M., Weigel, D. (2010) Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in Arabidopsis thaliana. *Nature*, **465**, 632-636.
- Tonsor, S. J., Alonso-Blanco, C., Koornneef, M. (2005) Gene function beyond the single trait: natural variation, gene effects, and evolutionary ecology in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell and Environment*, **28**, 2-20.

- Tsurumi, S., Ohwaki, Y.** (1978) Transport of <sup>14</sup>C-labeled indoleacetic acid in *Vicia* root segments. *Plant and Cell Physiology*, **19**, 1195-1206.
- Tuinstra, M. R., Ejeta, G., Goldsbrough, P. B.** (1997) Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 1005-1011.
- Ulrich, K.** (2013) Population and quantitative genetic analysis of auxin response pathways in *Arabidopsis thaliana*. Dissertationsschrift.
- Undurraga, S. F., Press, M. O., Legendre, M., Bujdoso, N., Bale, J., Wang, H., Davis, S. J., Verstrepen, K. J., Queitsch, C.** (2012) Background-dependent effects of polyglutamine variation in the *Arabidopsis thaliana* gene ELF3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **109**, 19363-19367.
- van Leeuwen, H., Kliebenstein, D. J., West, M. A. L., Kim, K., van Poecke, R., Katagiri, F., Micheltore, R. W., Doerge, R. W., St. Clair, D. A.** (2007) Natural variation among *Arabidopsis thaliana* accessions for transcriptome response to exogenous salicylic acid. *The Plant Cell*, **19**, 2099-2110.
- van Zanten, M., Voesenek, L. A. C. J., Peeters, A. J. M., Millenaar, F. F.** (2009) Hormone- and light-mediated regulation of heat-induced differential petiole growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **151**, 1446-1458.
- Vandenbussche, F., Verbelen, J.-P., van Der Straeten, D.** (2005) Of light and length: regulation of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *BioEssays*, **27**, 275-284.
- Vert, G., Walcher, C. L., Chory, J., Nemhauser, J. L.** (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **105**, 9829-9834.
- Wang, L., Kim, J., Somers, D. E.** (2013) Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **110**, 761-766.
- Weigel, D.** (2012) Natural variation in *Arabidopsis*: from molecular genetics to ecological genomics. *Plant Physiology*, **158**, 2-22.
- Went, F. W., Thimann, K. V.** (1937) *Phytohormones*. Macmillan (USA).
- Wilczek, A. M., Roe, J. L., Knapp, M. C., Cooper, M. D., Lopez-Gallego, C., Martin, L. J., Muir, C. D., Sim, S., Walker, A., Anderson, J., Egan, J. F., Moyers, B. T., Petipas, R., Giakountis, A., Charbit, E., Coupland, G., Welch, S. M., Schmitt, J.** (2009) Effects of genetic perturbation on seasonal life history plasticity. *Science*, **323**, 930-934.
- Wilkins, M. B., Scott, T. K.** (1968) Auxin transport in roots. *Nature*, **219**, 1388-1389.
- Wilmoth, J. C., Wang, S., Tiwari, S. B., Joshi, A. D., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Reed, J. W.** (2005) NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *The Plant Journal*, **43**, 118-130.
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J., Zhao, Y.** (2011) Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **108**, 18518-18523.
- Woodward, A. W., Bartel, B.** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, **95**, 707-735.

- Wright, F. A., Kong, A.** (1997) Linkage mapping in experimental crosses: the robustness of single-gene models. *Genetics*, **146**, 417-425.
- Yang, H., Murphy A. S.** (2009) Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Journal*, **59**, 179-191.
- Yang, Y., Hammes, U. Z., Taylor, C. G., Schachtman, D. P., Nielsen, E.** (2006) High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology*, **16**, 1123–1127.
- Yano, M.** (2001) Genetic and molecular dissection of naturally occurring variation. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 130-135.
- Yoshida, R., Fekih, R., Fujiwara, S., Oda, A., Miyata, K., Tomozoe, Y., Nakagawa, M., Niinuma, K., Hayashi, K., Ezura, H., Coupland, G., Mizoguchi, T.** (2009) Possible role of EARLY FLOWERING 3 (ELF3) in clock-dependent floral regulation by SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, **182**, 838-850.
- Yu, J.-W., Rubio, V., Lee, N.-Y., Bai, S., Lee, S.-Y., Kim, S.-S., Liu, L., Zhang, Y., Irigoyen, M. L., Sullivan, J. A., Zhang, Y., Lee, I., Xie, Q., Paek, N.-C., Deng, X. W.** (2008) COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Molecular Cell*, **32**, 617-630.
- Zagotta, M. T., Hicks, K. A., Jacobs, C. I., Young, J. C., Hangarter, R. P., Meeks-Wagner, D. R.** (1996) The Arabidopsis ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *The Plant Journal*, **10**, 691-702.
- Zazimalova, E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyerova, K., Hosek, P.** (2010) Auxin transporters - why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**, a001552.
- Zeng, Z.-B.** (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, **136**, 1457–1468.
- Zeller, G., Clark, R., Schneeberger, K., Bohlen, A., Weigel, D., Ratsch, G.** (2008) Detecting polymorphic regions in *Arabidopsis thaliana* with resequencing microarrays. *Genome Research*, **18**, 918-929.
- Zhang, Y., Liu, Z., Wang, L., Zheng, S., Xie, J., Bi, Y.** (2010) Sucrose-induced hypocotyl elongation of *Arabidopsis* seedlings in darkness depends on the presence of gibberellins. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 1130-1136.
- Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D.** (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, **291**, 306-309.

### Danksagung

Die Analyse von Vererbungsmodalitäten bereicherte nicht nur meinen wissenschaftlichen Werdegang, sondern auch mein Privatleben. Danke Oskar, dass es Dich gibt und Du uns viele Jahre Hypothesen über Vererbungsmodalitäten aufstellen lässt.

Zu diesem Enthusiasmus für die Wissenschaft haben viele Menschen beigetragen: Vor allem bei Dr. Marcel Quint möchte ich mich für die Begeisterung an der klassischen Genetik sehr herzlich bedanken. Vielen Dank für Deine stets offene Tür, Dein Vertrauen und Zuversicht in mich, dass auch durch etwaige Umwege und Rückschläge nicht erschüttert werden konnte.

An dieser Stelle gilt auch mein besonderer Dank Prof. Dr. Dierk Scheel, der mir die Möglichkeit gab, meine Forschung in seiner Abteilung durchzuführen und meine Promotionsarbeit am IPB anzufertigen. Außerdem danke ich ihm sowie den zwei weiteren Gutachtern und der Prüfungskommission für ihren Anteil am Verfahren.

Maßgeblichen Anteil am Fortschreiten dieser Arbeit tragen Dr. Carolin Delker, Dr. Bernhard Saal und Dr. Lore Westphal. Für Eure unerschöpfliche Geduld Fragen zu beantworten, die stets konstruktiven Ratschläge sowie Diskussionen und all die vielen aufmunternden Worte in schwierigen Zeiten danke ich Euch.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Kristian Ullrich. Ohne die QTL-Kartierung hätte diese Arbeit nicht fertiggestellt werden können. Bei Kathrin Denk und all den hilfreichen Studenten, allen voran Annemarie Glöckner und Sebastian Becker, möchte ich mich für Eure Ausdauer und Geduld für meine Mammutprojekte bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei all den Gärtnern, Handwerkern und Computerspezialisten für die Hilfe im Arbeitsalltag. Bei Christine Camilleri und Karen Hicks bedanke ich mich für die Bereitstellung von Saatgut. Prof. Ph.D. Seth Davis und seinen Mitarbeitern danke ich für die Denkanstöße zur ELF3-Funktionsweise.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Prof. Dr. Stefan Abel und allen Mitarbeitern für die herzliche und wissenschaftlich inspirierende Integration in der Abteilung Molekulare Signalverarbeitung. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei vor allem Antje, Carolin, Jana, Kathrin, Kristian, Marcel und Nadine, Euren Kindern und Partnern. Es ist einzigartig, so viele schöne Stunden (nicht nur an der Sterilbank) mit Euch verbracht zu haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: Bei meiner Mutter Marlies und meinem Bruder Andreas, vor allem aber bei meinem Vater Wolfgang, der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr erleben durfte. Danke, dass Ihr mich immer bei der Erfüllung meiner Träume unterstützt und gefördert habt. Ein herzlicher Dank gilt all meinen Freunden für Eure jahrelange Treue, auch wenn meine Forschung oft Priorität hatte. Besonders bei Tino möchte ich mich bedanken, dass Du immer mit mir durch dick und dünn gegangen bist. Danke, dass es Dich und Oskar gibt.



**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle/Saale, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Anja Raschke

## Lebenslauf

### Persönliche Informationen:

Name: Anja Raschke  
 Geburtsdatum, -ort: 12. Januar 1982, Halle/Saale  
 Familienstand: ledig, ein Kind

### Werdegang:

08/2012-11/2012 Gastwissenschaftler an der Schwedischen Landwirtschaftsuniversität (SLU), Institut für Pflanzenbiologie und Forstgenetik (Prof. Dr. L. Hennig), Uppsala, Schweden

seit 04/2007 Doktorandin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Unabhängige Nachwuchsforschergruppe Auxin-Signaltransduktion (Dr. M. Quint), Halle/Saale

10/2001-12/2006 Universitätsstudium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Studienschwerpunkte: Genetik, Pflanzenphysiologie, Phytopathologie und Biochemie)

Diplom in Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Genetik, Abteilung Pflanzengenetik (Prof. Dr. U. Bonas)

„Charakterisierung von pflanzlichen Interaktionspartnern des Effektorproteins AvrBs3 und Analysen zur biologischen Relevanz der Interaktion in der Pflanze“

10/2000-10/2001 Universitätsstudium der Politikwissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

07/2000 Allgemeine Hochschulreife (Schwerpunktfächer: Biologie und Chemie)

09/1988-07/2000 Schulische Ausbildung am Johann-Gottfried-Herder Gymnasium, Halle/Saale, Deutschland und Otto-Brosowsky-Grundschule, Halle/Saale

### Konferenzteilnahme:

#### Vorträge:

2011 '7<sup>th</sup> Plant Science Student Conference', Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Halle/Saale

2010 '6<sup>th</sup> Plant Science Student Conference', Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben

- 2009 '5<sup>th</sup> Plant Science Student Conference', Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Halle/Saale
- 2008 '1<sup>st</sup> International Ph.D. school on Plant Development', Retzbach-Würzburg
- 2008 'Ph.D. work shop: Natural variation in plants', Botanical Centre of the Wageningen University, Wageningen, Niederlande
- 2008 '4<sup>th</sup> Plant Science Student Conference', Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben

Poster:

- 2011 Botanikertagung 2011, Berlin
- 2010 '7<sup>th</sup> Tri-National Arabidopsis Meeting', Salzburg, Österreich
- 2009 Botanikertagung 2009, Leipzig
- 2009 'Plant Genomics and Beyond', Evry, Frankreich
- 2007 '3<sup>rd</sup> Plant Science Student Conference', Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Halle/Saale

**Publikationen:**

Delker, C., Pöschl, Y., Raschke, A., Ullrich, K., Ettingshausen, S., Hauptmann, V., Grosse, I., Quint M. (2010) Natural variation of transcriptional auxin response networks in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, **22**, 2184-2200.

Delker, C., Raschke, A., Quint, M. (2008) Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta*, **227**, 929-941

Halle/Saale, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Anja Raschke