



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im  
Fachbereich Biologie / Chemie der Universität Osnabrück

---

**Evolutionäre Entwicklungsgenetik der Fruchtöffnung in  
Brassicaceen**

von  
Andreas Mühlhausen

Osnabrück, April 2011

Hauptberichterstatter: apl. Prof. Dr. Klaus Mummenhoff

Nebenberichterstatter: Prof. Dr. Günter Theißen

eingereicht am 26. April 2011



*Lepidium campestre*, beginnende Blüte

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Allgemeines zu den Brassicaceen	1
1.2	Die Gattung <i>Lepidium</i>	2
1.3	Fruchtöffnung in <i>Arabidopsis thaliana</i> – 1. Anatomie	4
1.4	Fruchtöffnung in <i>Arabidopsis thaliana</i> – 2. Genetische Regulation	6
1.5	Fruchtanatomie in <i>Lepidium</i>	8
1.6	Genfamilien der untersuchten Fruchtentwicklungsgene	10
1.6.1	MADS-Box Genfamilie ( <i>FUL</i> , <i>SHP1</i> , <i>SHP2</i> )	10
1.6.2	bHLH Genfamilie ( <i>ALC</i> , <i>IND</i> )	12
1.6.3	Superfamilie der Homöobox-Gene ( <i>RPL</i> )	13
1.7	Fruchtöffnung in der Gattung <i>Aethionema</i> W.T. Aiton	15
1.8	Zielsetzung	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Pflanzenmaterial	18
2.2	Blühinduktion und Ernte von Blüten und Früchten	18
2.3	Isolation von genomischer DNA (DOYLE & DOYLE 1987, verändert)	20
2.4	Isolation von total-RNA	21
2.5	Isolation von Fruchtentwicklungsgenen	22
2.5.1	Primerdesign	22
2.5.2	Reverse Transkription – cDNA-Synthese	22
2.5.3	3'RACE	23
2.5.4	Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel	24
2.5.5	Gelaufreinigung	24
2.5.6	Klonieren	25
2.5.6.1	A-tailing	25
2.5.6.2	Ligation	25
2.5.6.3	Transformation chemisch kompetenter Zellen	26
2.5.6.4	Restriktion und Colony-PCR	26
2.5.6.5	Plasmid-Isolation	27
2.5.6.6	Sequenzierung und Auswertung	27
2.5.7	5'RACE	28
2.5.8	Volllängenklone	29
2.5.9	Glycerinkulturen	29
2.6	Phylogenetische Analysen	29
2.6.1	Ermittlung von Sequenzhomologien	30
2.6.2	Neighbor Joining Methode	30
2.6.3	Bayesische Phylogenierekonstruktion	31
2.6.4	Bootstrap-Analyse	31
2.7	Raum-Zeitliche Genexpressionsanalysen – <i>in situ</i> Hybridisierung	34
2.7.1	Etablierung der <i>in situ</i> Hybridisierung in <i>Lepidium</i>	34
2.7.2	Einbetten von Pflanzengeweben	35
2.7.2.1	Fixierung in FAE / Paraformaldehyd	35
2.7.2.2	Einbetten in Paraffin	35

---

2.7.2.3	Erstellen von Gewebeschnitten am Mikrotom	35
2.7.3	<i>in situ</i> Sondentemplate	36
2.7.4	<i>in vitro</i> Transkription	36
2.7.5	Hydrolyse von RNA-Sonden	37
2.7.6	Qualitätsabschätzung von RNA-Sonden	37
2.7.7	<i>in situ</i> Hybridisierung	38
2.7.7.1	Vorbehandlung histologischer Schnitte	38
2.7.7.2	Hybridisierung	38
2.7.7.3	Immunologische Detektion	38
2.7.7.4	Mikroskopische Auswertung	39
2.8	Southern Blot	39
2.8.1	Southern Hybridisierung	40
2.9	Northern Blot	40
2.9.1	„Housekeeping Genes“	40
2.9.2	Denaturierendes Agarosegel	41
2.9.3	RNA-Transfer	41
2.9.4	Sonden	41
2.9.5	Northern Hybridisierung und Phosphor-Imaging	42
2.10	Pollenschlauchwachstum	42
2.10.1	Blütenfixierung	42
2.10.2	Färben der Pollenschläuche	43
2.11	Kreuzungsexperimente	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1	Isolation von Fruchtentwicklungsgenen	44
3.1.1	3'-RACE – Isolation von Fruchtentwicklungsgenen	44
3.1.2	5'-RACE – Isolation von Fruchtentwicklungsgenen	44
3.1.3	Herstellung von Vollängenklonen	44
3.2	Sequenzhomologien der untersuchten Fruchtentwicklungsgene	46
3.3	Phylogenetische Analysen der Fruchtentwicklungsgene	48
3.3.1	Neighbor Joining Analysen der Fruchtentwicklungsgene	54
3.3.2	Bayesische und Bootstrap-Analysen der Fruchtentwicklungsgene	55
3.3.2.1	MADS-Box Phylogenie	56
3.3.2.2	BELL-Phylogenie	59
3.4	Southern Hybridisierung	60
3.5	<i>in situ</i> Hybridisierung der untersuchten Fruchtentwicklungsgene	62
3.5.1	Fruchtklappenrand-Identitätsgene	63
3.5.2	Repressorgene <i>FUL</i> und <i>RPL</i>	69
3.6	Northern Hybridisierung der Fruchtentwicklungsgene	71
3.7	Versuche zum Pollenschlauchwachstum	74
3.8	Kreuzungsversuche zwischen <i>L. campestre</i> und <i>L. appelianum</i>	75
3.9	Anatomie von <i>Aethionema carneum</i> -Früchten	76
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	Kreuzungsversuche	79
4.2	Charakterisierung von Fruchtentwicklungsgenen der untersuchten <i>Lepidium</i> -Arten	80

---

4.2.1	Single-copy- oder multi-copy-Gene?	80
4.2.2	Vergleich der Aminosäuresequenzen der analysierten Fruchtentwicklungsgene mit <i>A. thaliana</i>	81
	- MADS-Box Gene <i>SHP1</i> , <i>SHP2</i> und <i>FUL</i>	81
	- BELL-Homöodomänen-Gen <i>RPL</i>	82
	- Mögliche regulatorische Konsequenz eines veränderten <i>REPLUMLESS</i>	83
	- Ortholog versus paralog	83
4.3	Phylogenetische Analysen der Fruchtentwicklungsgene	84
4.4	Evolution der genetischen Regulation der Fruchttöffnung in <i>Lepidium</i>	87
	- <i>Lepidium campestre</i> – Öffnungsfrüchte	87
	- <i>Lepidium appelianum</i> – Schließfrüchte	88
	- Expressionsmuster der Fruchtentwicklungsgene – <i>L. campestre</i> vs <i>L. appelianum</i>	88
	- <i>SHATTERPROOF</i> -Gene	88
	- <i>REPLUMLESS</i>	90
	- Beteiligung von BELL- und KNOX-Genen an Indehiszenz in <i>L. appelianum</i> ?	91
	- Beteiligung von <i>AGAMOUS</i> an Indehiszenz in <i>L. appelianum</i> ?	92
	- Prädisposition als Voraussetzung für Indehiszenz in <i>L. appelianum</i> ?	93
	- <i>FRUITFULL</i>	94
4.4.1	Genetische Regulation heterokarper <i>Aethionema</i> -Früchte	97
4.5	Ökologie der Samenausbreitung – Dehiszenz, Indehiszenz und Heterokarpie	99
4.6	Vorzeitige Fruchttöffnung und Herstellung von GVOs	104
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>121</b>
7.1	Verwendete Primer	121
7.2	Puffer und Lösungen	123
7.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte	125
7.4	Vektorkarten	128

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

1.1	Bayesische ITS-Phylogenie der Gattung <i>Lepidium</i> s.l.	3
1.2	Schematische Darstellung der Fruchttöffnung bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.3	Genetische Regulation der Fruchttöffnung bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
1.4	Querschnitte der Fruchtanatomie von <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Lepidium campestre</i> und <i>Lepidium appelianum</i> .	9
2.1	Blüten- und Fruchtstadien von <i>L. appelianum</i> und <i>L. campestre</i>	20
3.1	3'-RACE-Fragmente der untersuchten <i>Lepidium</i> -Gene	45
3.2	Volllängenklone der untersuchten <i>Lepidium</i> -Gene	46
3.3 a	Aminosäure-Alignment <i>SHP1</i>	49
3.3 b	Aminosäure-Alignment <i>SHP2</i>	50
3.3 c	Aminosäure-Alignment <i>FUL</i>	51
3.3 d	Aminosäure-Alignment <i>RPL</i>	52
3.4	Neighbor Joining Analyse der MADS-Box Gene	54
3.5	Neighbor Joining Analyse der BELL-Homöodomänen-Gene	55
3.6	Bayesische MADS-Box-Gen-Phylogenie	57
3.7	Bayesische BELL-Homöodomänen-Gen-Phylogenie	59
3.8	Southern Hybridisierung der untersuchten Fruchtentwicklungsgene	61
3.9	<i>in situ</i> Hybridisierung <i>SHP1</i>	64
3.10	<i>in situ</i> Hybridisierung <i>SHP2</i>	65
3.11	<i>in situ</i> Hybridisierung <i>ALC</i>	66
3.12	<i>in situ</i> Hybridisierung <i>IND</i>	67
3.13	<i>in situ</i> Hybridisierung <i>FUL</i>	70
3.14	<i>in situ</i> Hybridisierung <i>RPL</i>	71
3.15	Northern Hybridisierung	72
3.16	Pollenschlauchwachstum bei <i>Lepidium</i>	74
3.17	Fruchtanatomie von <i>Aethionema carneum</i> Öffnungs- und Schließfrüchten	76
3.18	Morphologie von Früchten und Samen bei <i>Aethionema carneum</i>	77
4.1	Hypothesen zur Evolution der genetischen Regulation der Fruchttöffnung in <i>L. appelianum</i>	95

### Tabellen

2.1	Herkunftsdaten des verwendeten Pflanzenmaterials	19
2.2	Auflistung der in phylogenetischen Analysen herangezogenen Gene	32
3.1	Länge der kodierenden Sequenzen der Fruchtentwicklungsgene von <i>L. appelianum</i> , <i>L. campestre</i> und <i>Ae. carneum</i> und <i>A. thaliana</i>	46
3.2	Sequenzähnlichkeiten putativ orthologer Gene von <i>L. appelianum</i> , <i>L. campestre</i> , <i>Ae. carneum</i> und <i>A. thaliana</i>	47
3.3	Ergebnisse der Kreuzungsversuche	75
7.1	Für die vorliegende Arbeit verwendete Primer	121

## Abkürzungsverzeichnis

<i>Ae.</i>	<i>Aethionema</i>
<i>Aec.</i>	<i>Aethionema carneum</i>
<i>adc</i>	Arginin-Decarboxylase
<i>AG</i>	<i>AGAMOUS</i>
<i>AGL</i>	<i>AGAMOUS-like</i>
<i>ALC</i>	<i>ALCATRAZ</i>
<i>AP(1,2,3)</i>	<i>APETALA (1,2,3)</i>
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-3-chloro-indoyl-phosphat-p-Toluidin-Salz
bHLH	basic Helix-loop-Helix
<i>CAL</i>	<i>CAULIFLOWER</i>
cDNA	complementary DNA
CDS	kodierende Sequenz
CTAB	Cetyltrimethylammonium-Bromid
<i>DEF</i>	<i>DEFICIENS</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dehiszenzzone
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAE	Formaldehyd-Essigsäure-Ethanol
<i>FIL</i>	<i>FILAMENTOUS FLOWER</i>
<i>FUL</i>	<i>FRUITFULL</i>
fwd	forward
gDNA	genomische DNA
GVOs	Genveränderte Organismen
HCl	Salzsäure
<i>IND</i>	<i>INDEHISCENT</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<i>JAG</i>	<i>JAGGED</i>
kb	Kilobasen
<i>La</i>	<i>Lepidium appelianum</i>
<i>Lc</i>	<i>Lepidium campestre</i>
<i>LFY</i>	<i>LEAFY</i>
<i>LUG</i>	<i>LEUNIG</i>
mbar	Millibar
<i>MCM1</i>	<i>Minichromosome maintenance protein 1</i>
Mio.	Millionen
mRNA	messenger-RNA
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitro-Blautetrazoliumchlorid
ORF	open reading frame

PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>PI</i>	<i>PISTILLATA</i>
PP	Posterior Propability
RACE	<u>R</u> apid <u>A</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>e</u> nds
rev	revers
RNA	Ribonukleinsäure
<i>RPL</i>	<i>REPLUMLESS</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
<i>SEP</i>	<i>SEPALLATA</i>
<i>SEU</i>	<i>SEUSS</i>
<i>SHP1</i>	<i>SHATTERPROOF1</i>
<i>SHP2</i>	<i>SHATTERPROOF2</i>
s.l.	sensu lato
SP	spezifischer Primer
<i>SRF</i>	<i>Serum Response Factor</i>
s.s.	sensu stricto
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
VMZ	verholzte Mesokarp-Zellen
<i>WUS</i>	<i>WUSCHEL</i>
X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
<i>YAB3</i>	<i>YABBY3</i>



## 1 Einleitung

### 1.1 Allgemeines zu den Brassicaceen

Die Änderung bestimmter morphologischer Merkmale, wie etwa die Fruchtform, ist insbesondere in der Familie der Kreuzblütengewächse (Brassicaceae) ein bekanntes Phänomen. Viele Gattungen wie *Heliophila*, (AL-SHEHBAZ & MUMMENHOFF 2005; MUMMENHOFF *et al.* 2005) *Thlaspi*, (KOCH & MUMMENHOFF 2001; MUMMENHOFF *et al.* 2001b) oder *Lepidium* (AL-SHEHBAZ *et al.* 2002; MUMMENHOFF *et al.* 2009) weisen nach Analysen molekularer Marker einen hohen Homoplasiegrad auf, was in der Vergangenheit zu falschen Schlussfolgerungen bei der Klassifizierung führte. Auch in anderen Familien ist das Phänomen der parallelen Entwicklung morphologischer Merkmale wie Fruchtform oder der Entwicklung zygomorpher Blüten bekannt (BREMER & ERIKSSON 1992; CLAUSING *et al.* 2000; HALL *et al.* 2002; PATTERSON & GIVNISH 2002; ZJHRA *et al.* 2004).

Zumeist wurden bei frühen Klassifizierungen morphologische Merkmale wie z.B. Fruchtformen verwendet, die sich jedoch häufig parallel entwickelt haben und nicht die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse widerspiegeln. Aber auch unscheinbare morphologische Merkmale wie die unvollständig ausgebildeten Scheidewände (Septen) in *Armoracia* und *Neobeckia*, welche als Merkmal einer nahen Verwandtschaft zugrunde gelegt wurden, legen die zahlreichen Parallelismen der Merkmalsevolution dar. So konnte LES (1994) zeigen, dass die Gattungen *Armoracia* und *Neobeckia* nicht als eine Verwandtschaftsgruppe anzusehen sind; vielmehr ist *Neobeckia* näher mit *Rorippa* als mit *Armoracia* verwandt.

Diese Beispiele stehen im Gegensatz zu den klassischen systematischen Einordnungen aus dem frühen 20. Jahrhundert (THELLUNG 1906; HAYEK 1911; SCHULZ 1936), welche überwiegend morphologische Merkmale zur systematischen Klassifizierung zu Grunde legten.

Innerhalb der Familie der Brassicaceae findet sich eine Vielzahl an Arten, deren Samen bei Fruchtreife nicht freigesetzt werden, sondern stattdessen von einer zum Teil verholzenden Fruchthülle umschlossen bleiben (COUSENS *et al.* 2010). Die Gründe, welche zur Evolution dieser **Schließfrüchte** führen, können unterschiedlich sein. Auswüchse am Perikarp von Schließfrüchten können eine Ausbreitung durch Tiere gewährleisten. Sie können ebenso als Fraßschutz dienen oder chemisch bzw. physikalisch die Dormanz von Samen regulieren (COUSENS *et al.* 2010; LU *et al.* 2010). Mit Dormanz wird ein angeborenes fehlendes Keimungsvermögen von Samen

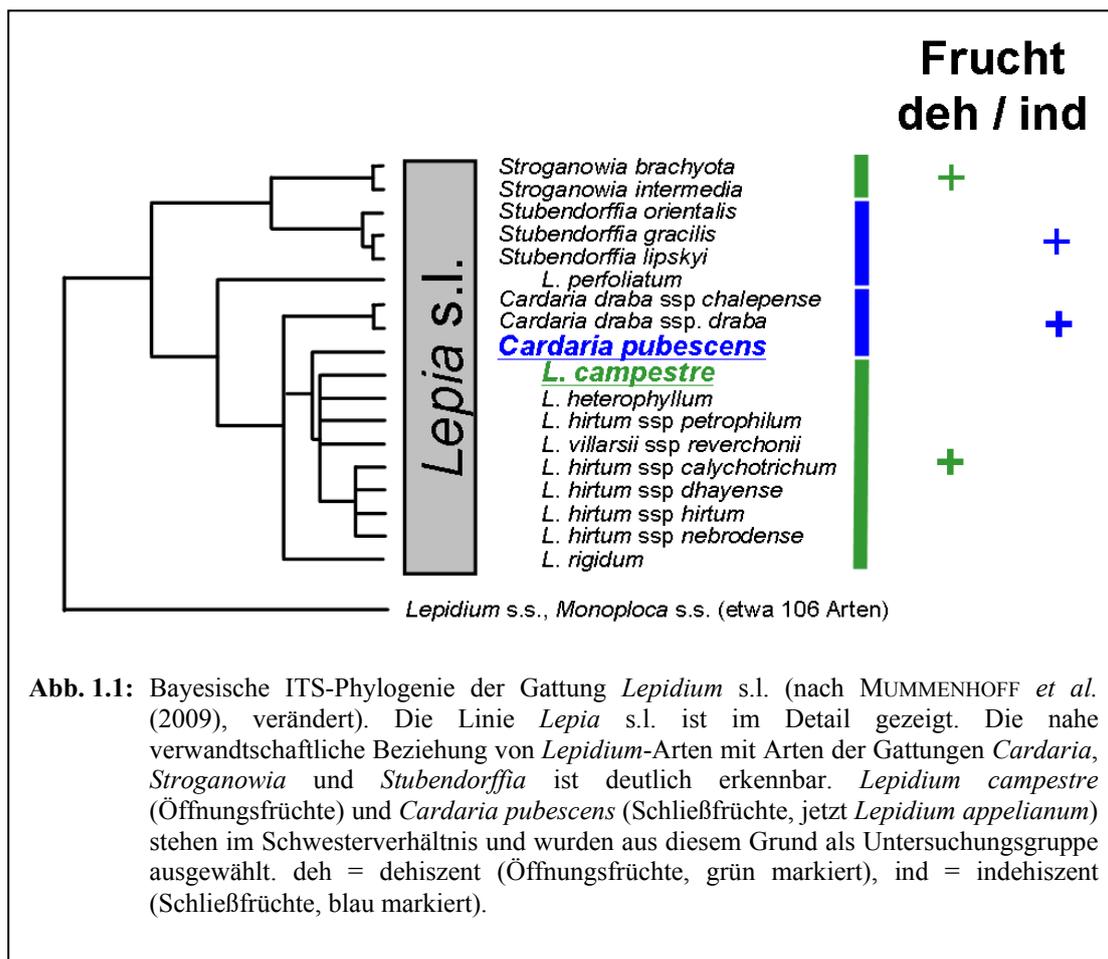
innerhalb eines bestimmten Zeitraumes bezeichnet, während dem die ökologischen Keimungsverhältnisse für die Keimung jedoch eigentlich ideal wären. Nachdem die Dormanz der betreffenden Samen gebrochen wurde, können diese Samen schließlich zur Keimung kommen (BASKIN & BASKIN 2004; FINCH-SAVAGE & LEUBNER-METZGER 2006). Weiterhin argumentieren COUSENS *et al.* (2010), dass die nur langsam verrottenden Fruchthüllen von Schließfrüchten den innen befindlichen Samen einen weiteren Schutz bieten und – besonders in ariden Gebieten – einen Verdunstungsschutz darstellen, nachdem die Samen bei Niederschlag durchgequollen sind und zu keimen begonnen haben. So wird ein Austrocknen des keimenden Samens verhindert, was den Tod des noch jungen Keimlings zur Folge hätte. **Öffnungsfrüchte** hingegen entlassen ihre Samen in die Umwelt, wodurch kein Schutz mehr durch die Fruchthülle gewährleistet werden kann. Häufig besitzen diese Samen die Fähigkeit, bei Benetzung mit Wasser zu verschleimen, wie etwa bei Arten der Gattung *Lepidium* (AL-SHEHBAZ 1986; MUMMENHOFF *et al.* 2001a). Diese Verschleimung der Samen kann einerseits dem Ferntransport dienen (MUMMENHOFF & FRANZKE 2007), aber auch bei der Keimung eine wichtige Rolle spielen, indem sie die Wasserversorgung des sehr jungen Keimlings über eine längere Trockenphase gewährleisten kann (YOUNG *et al.* 1970; ANDRES *et al.* 1995).

## 1.2 Die Gattung *Lepidium*

Eine Gattung, in der sowohl Öffnungs- als auch Schließfrüchte vorkommen, ist die Gattung *Lepidium* (MUMMENHOFF *et al.* 2001a; MUMMENHOFF *et al.* 2009). *Lepidium* gehört zur Familie der Brassicaceen, die je nach Autor 170 – 230 Arten umfasst (WARWICK *et al.* 2006; FRANCIS & WARWICK 2008; AL-SHEHBAZ & MUMMENHOFF 2011) und mit Ausnahme der warm-tropischen Regionen sowie der Polargebiete weltweit verbreitet ist. Ursprünglich sind die Arten der Gattung *Lepidium* dadurch charakterisiert, dass sie Öffnungsfrüchte hervorbringen (THELLUNG 1906). Verwandte Arten mit Schließfrüchten wurden in älteren Klassifizierungen unter anderem aufgrund dieses morphologischen Merkmals meist in mono- und oligotypischen eigenen Gattungen geführt (PRANTL 1891; SCHULZ 1936). Jüngst konnten auf molekularer Ebene Hinweise dafür gefunden werden, dass die Gattungen *Stroganowia*, *Winklera*, *Stubendorffia*, *Coronopus* und *Cardaria* mit *Lepidium* zusammengefasst werden sollten (MUMMENHOFF *et al.* 2001a; MUMMENHOFF *et al.* 2009) (AL-SHEHBAZ & MUMMENHOFF 2011). Die Arten dieser oligotypischen, aber

nah verwandten Gattungen weisen allesamt einen zumindest abgewandelten Fruchttyp im Vergleich zu Arten von *Lepidium* s.s. auf. So kommen in den Gattungen *Cardaria* und *Stubendorffia* Taxa mit Schließfrüchten vor, einige Taxa der Gattungen *Winklera* und *Coronopus* produzieren Spaltfrüchte (didymous fruits). Bei diesen lösen sich zwar die Fruchtklappen vom Replum (einer Öffnungsfrucht gleich), die Öffnung der Fruchthälften ist jedoch zu klein, als dass die Samen aus der Frucht entweichen könnten. Es handelt sich bei diesen Früchten also zumindest funktional ebenfalls um Schließfrüchte (MUMMENHOFF *et al.* 2009).

Die Gattung *Lepidium* spaltet sich in drei Hauptlinien auf (MUMMENHOFF *et al.* 2001a), wobei die schließfrüchtigen Arten der ursprünglich als *Cardaria* bezeichneten Gattung zusammen mit *Lepidium*-Arten innerhalb der Lineage II (*Lepia* s.l.) im Schwesterverhältnis stehen (Abb. 1.1) (MUMMENHOFF *et al.* 2001a; MUMMENHOFF *et al.* 2009).



Mittels molekularer Analysen konnte innerhalb von *Lepia* ein Schwesterartenpaar detektiert werden: *Lepidium campestre* (L.) R.Br. mit Öffnungsfrüchten sowie eine zweite Art – bisher unter dem Namen *Cardaria pubescens* C.A. Meyer (Jarmolenko) bekannt – die durch die Ausbildung von Schließfrüchten charakterisiert ist. *Cardaria pubescens* wird inzwischen unter dem Namen *Lepidium appelianum* Al-Shehbaz geführt (AL-SHEHBAZ *et al.* 2002), diese Nomenklatur wird auch nachfolgend verwendet.

In der vorliegenden Arbeit soll nun anhand molekularer und entwicklungsbiologischer Analysen die Evolution von Öffnungsfrüchten hin zu Schließfrüchten innerhalb der Gattung *Lepidium* untersucht werden.

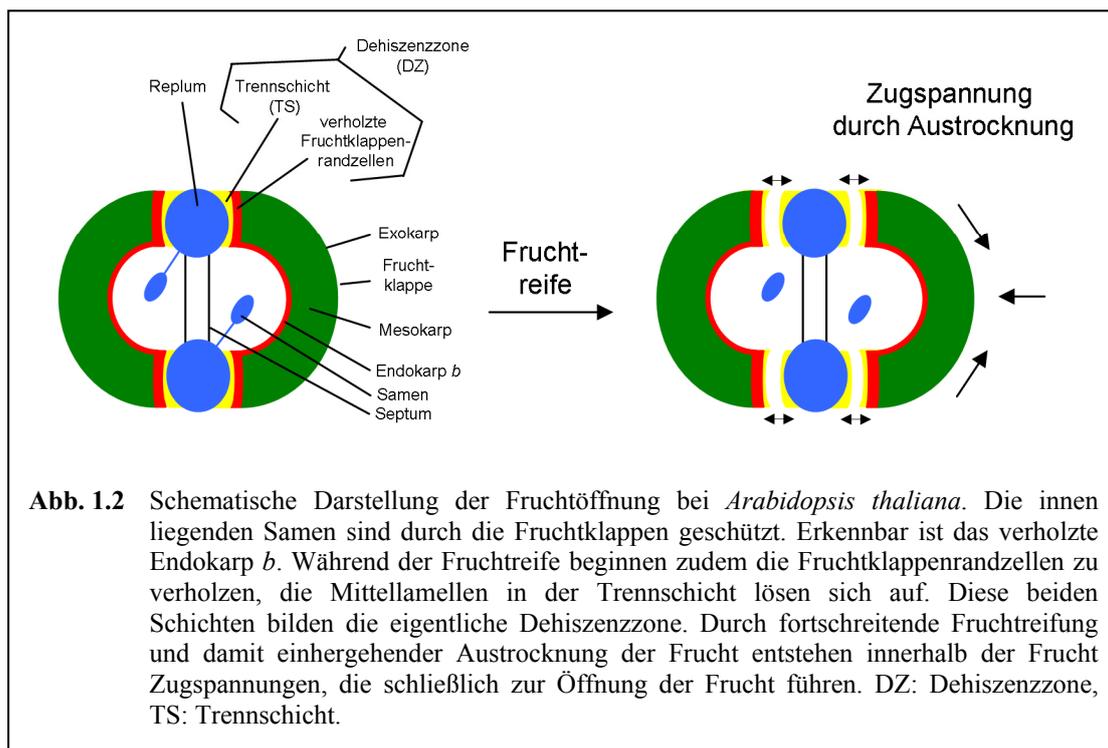
Der Umstand, dass ein Artenpaar trotz sehr naher Verwandtschaft mit unterschiedlichen Fruchtöffnungssystemen zur Verfügung steht, ist geradezu ideal für die Untersuchung der Evolution dieses Merkmals. Die Tatsache, dass überdies beide Arten diploid sind, vereinfacht Analysen auf genomischer Ebene, da nur mit einem Allel pro Gen zu rechnen ist.

### **1.3 Fruchttöffnung in *Arabidopsis thaliana* – 1. Anatomie**

Der letzte gemeinsame Vorfahre der Brassicaceen und der Cleomaceen, zweier nah verwandter Pflanzenfamilien, war wahrscheinlich durch Öffnungsfrüchte (dehiszente Früchte) charakterisiert (HALL *et al.* 2002), die anzestralen Brassicaceen sind demnach durch Dehiszenz charakterisiert. Während der Evolution kam es in den verschiedenen Entwicklungslinien der Brassicaceen wiederholt und unabhängig voneinander zur Ausbildung von Schließfrüchten (indehiszente Früchte). Innerhalb der Brassicaceen-Phylogenie finden sich je nach Autor zwischen 51 und 60 Gattungen, die Taxa mit zumindest funktional indehiszenten Früchten beinhalten, wobei einige dieser Gattungen mono- bzw. oligotypisch sind (APPEL & AL-SHEHBAZ 2003; BARTLEY & CROSS 2006; MÜHLHAUSEN *et al.* 2011); die tatsächliche Zahl natürlicher Gattungen dürfte etwas niedriger liegen. Bei einem Großteil aller Brassicaceen-Arten werden dehiszente Früchte ausgebildet, so dass die im Inneren der Frucht liegenden Samen bei Fruchtreife entlassen werden. Die Früchte besitzen häufig einen ähnlichen Aufbau und bestehen aus zwei Fruchtklappen, die an einer Fusionsstelle, dem Replum, zusammengewachsen sind. Das Replum ist durch eine falsche Scheidewand verbunden, welche als Septum bezeichnet wird (**Abb. 1.2**).

Für die Fruchttöffnung sind verschiedene anatomische Strukturen in der Frucht nötig. Bei der Betrachtung der Fruchtklappen im Querschnitt erkennt man funktional unterschiedliche Bereiche: die äußere Epidermis (Exokarp), ein daran angrenzendes Assimilationsgewebe (Mesokarp) sowie anschließend das Endokarp *b* (*enb*) mit kleinlumigen Zellen, welches während der Fruchtreife verholzt (**Abb. 1.2**). Nach innen abschließend befindet sich im unreifen Zustand der Frucht die innere Epidermis, das Endokarp *a*.

Im Bereich zwischen den Fruchtklappenrändern und dem Replum spielen sich bereits einige Zeit vor der Fruchtreife mehrere Prozesse ab. So wird in diesem Bereich eine Dehiszenzzone (DZ) ausgebildet, die sich in zwei Regionen unterteilt. Der vom Replum aus gesehen etwas weiter entfernte Bereich verholzt, man spricht hier von verholzten Fruchtklappenrandzellen. Daran anschließend in Richtung des Replums, jedoch erst in einem späteren Reifestadium zu erkennen (Entwicklungsstadium 18-19; (FERRANDIZ *et al.* 1999)), entwickelt sich eine Trennschicht. In diesem Bereich werden die Mittellamellen von hydrolytischen Enzymen aufgelöst, so dass die Zellen keinen Zusammenhalt mehr haben (MEAKIN & ROBERTS 1990a; MEAKIN & ROBERTS 1990b; SPENCE *et al.* 1996; RAJANI & SUNDARESAN 2001). Die Fruchtklappen lösen sich schließlich aufgrund einer Zugspannung, die durch Austrocknung des verholzten Endokarp *b* sowie der verholzten Fruchtklappenrandzellen entsteht, vom Replum und die Früchte entlassen ihre Samen in die Umwelt.



#### 1.4 Fruchttöffnung in *Arabidopsis thaliana* – 2. Genetische Regulation

Um die Fruchttöffnungsmechanismen in den Brassicaceen zu verstehen, wurden an der Modellpflanze *Arabidopsis* zahlreiche Analysen unternommen, mit deren Hilfe Schlussfolgerungen auf die genetische Regulation gezogen werden konnten. So konnte eine Regulationskaskade entschlüsselt werden, an der nicht weniger als sechs Gene direkt (in der Folge als „Fruchtentwicklungsgene“ bezeichnet) und zumindest drei weitere Gene regulatorisch beteiligt sind.

In der Dehiszenzzone sind die Transkriptionsfaktoren *SHATTERPROOF1* und *SHATTERPROOF2* (*SHP1,2*) exprimiert (LILJEGREN *et al.* 2000; DINNENY *et al.* 2005), zwei MADS-Box Gene, die in der Blüten- und Fruchtentwicklung mehrere wichtige Funktionen haben. So werden die *SHP*-Gene für die korrekte Ausbildung von Samenanlagen und Griffel benötigt und auch bei der Fruchttöffnung kommt den *SHP*-Genen eine entscheidende Rolle zu (FLANAGAN *et al.* 1996; FERRANDIZ *et al.* 2000; COLOMBO *et al.* 2010). Überdies wird zumindest für *SHP2* diskutiert, ob es eine wichtige Rolle bei der Samendormanz spielen könnte (BARRERO *et al.* 2010). Für die Regulation der Fruchttöffnung ist nun deren Expression in der DZ von Bedeutung, wo die *SHP*-Gene für die Aktivierung von *INDEHISCENT* und *ALCATRAZ* verantwortlich sind. Die Funktion von *INDEHISCENT* besteht darin, durch Abnahme der lokalen Auxinkonzentration für eine Verholzung der Fruchtklappenrandzellen zu sorgen (SOREFAN *et al.* 2009). Mit *ALCATRAZ* wird in der Dehiszenzzone durch die *SHP*-Gene ein weiteres Gen aktiviert, welches für die Fruchttöffnung eine entscheidende Bedeutung hat. *ALCATRAZ* ist ebenfalls in der DZ exprimiert und für die Ausbildung der eigentlichen Trennschicht verantwortlich, die sich zwischen den verholzten Fruchtklappenrandzellen und dem Replum entwickelt. Im Laufe der Fruchtentwicklung werden hier – vermittelt durch *ALCATRAZ* – Polygalakturonasen produziert (MEAKIN & ROBERTS 1990a; MEAKIN & ROBERTS 1990b; SPENCE *et al.* 1996; RAJANI & SUNDARESAN 2001). Diese die Mittellamellen auflösenden Enzyme, deren Mitwirken auch bei der Öffnung von Staubblättern nachgewiesen werden konnte (OGAWA *et al.* 2009), führen bei Öffnungsfrüchten dazu, dass mit fortschreitender Reife und Austrocknung der Frucht und der damit einhergehenden Zugspannungen in den verholzten Geweben mit der Fruchttöffnung die letzte Stufe der Fruchtentwicklung eingeleitet wird, die mit der Degradation der Mittellamellen, dem Ablösen der Fruchtklappen vom Replum sowie der Freisetzung der Samen beendet ist.

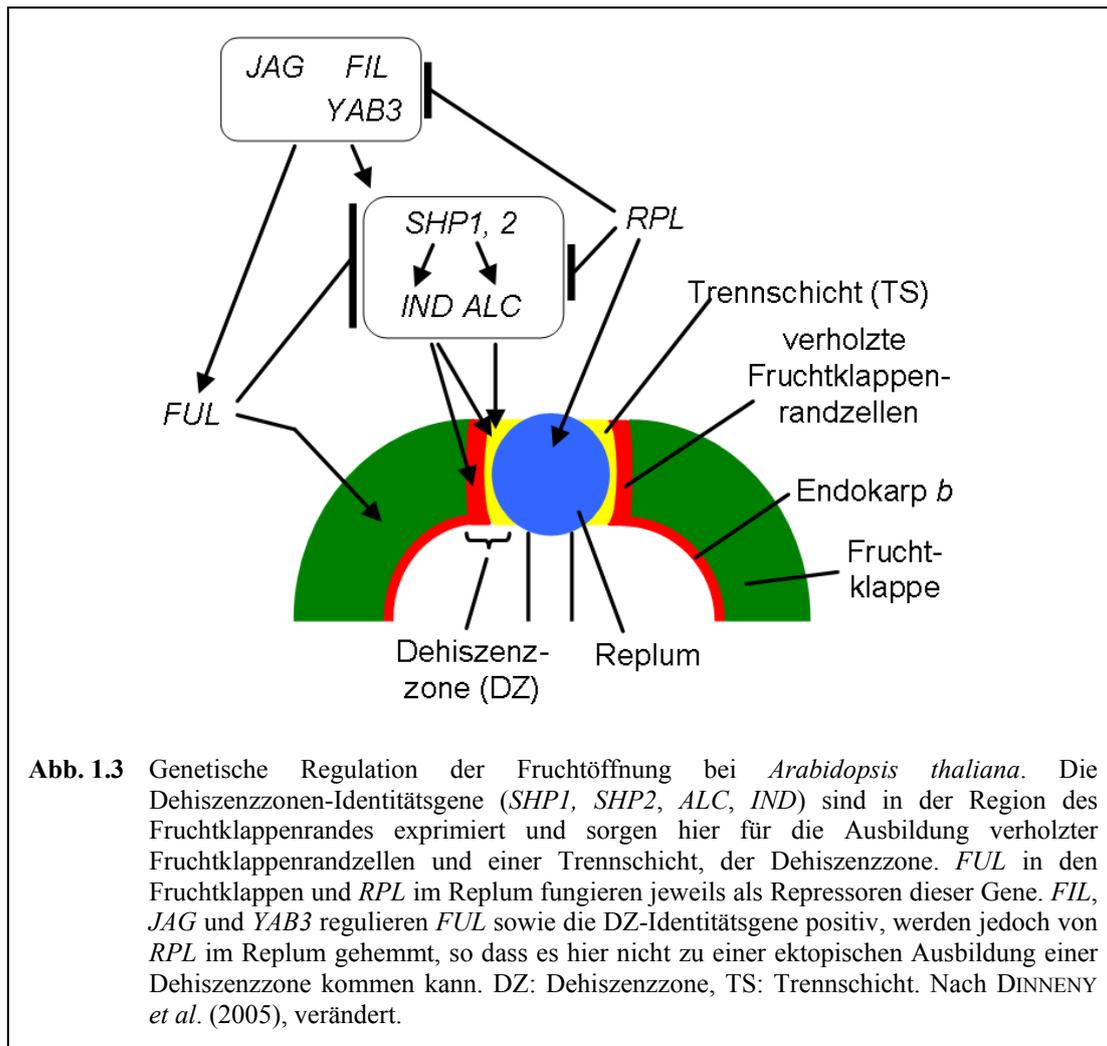
Zwei Transkriptionsfaktoren sind nun für die Limitierung dieser Fruchtklappenrand-Identitätsgene (*SHP1*, *SHP2*, *ALC*, *IND*) auf die DZ verantwortlich. Mit *FRUITFULL* ist in den Fruchtklappen ein weiteres MADS-Box Gen aktiv, welches direkt die Expression der *SHP*-Gene hemmt (FERRANDIZ *et al.* 2000). Somit wird indirekt auch die Expression von *IND* und *ALC* in den Fruchtklappen unterdrückt. *INDEHISCENT* ist zusätzlich für die Verholzung des Endokarp *b* verantwortlich, im übrigen Bereich der Fruchtklappen wird *IND* durch *FUL* unterdrückt (LILJEGREN *et al.* 2004).

Im Replum ist mit dem Bell-Homöodomänen-Gen *REPLUMLESS* ein weiteres Gen lokalisiert (ROEDER *et al.* 2003; DINNENY *et al.* 2005), welches im Replum die Expression der Fruchtklappenrand-Identitätsgene unterdrückt und so verhindert, dass sich ektopisch im Replum eine DZ ausbildet (**Abb. 1.3**). Allerdings scheint *REPLUMLESS* (Synonym: *PENNYWISE*, *PNY*, (SMITH & HAKE 2003)) hierbei als Co-Faktor mit einem weiteren, bislang unbekanntem Gen zu interagieren, da Überexpressionmutanten (*35S::PNY*) keine Phänotypenänderung bewirken und weiterhin Öffnungsfrüchte produzieren (MÜHLHAUSEN *et al.* 2011).

Die unterschiedlichen Funktionen der an der Regulation der Fruchtöffnung beteiligten Gene ließen sich mit Hilfe von loss-of-function Mutanten nachweisen. So bilden z.B. *shp1,2* Doppelmutanten keine DZ und damit Schließfrüchte aus, was auf die fehlende Expression von *IND* und *ALC* zurückzuführen ist (LILJEGREN *et al.* 2000). Die Funktion von *RPL* konnte mit Hilfe verschiedener Mutanten nachgewiesen werden. So unterbleibt bei *rpl*-Mutanten die Ausbildung von typischen Replum-Zellen, stattdessen zeigen die Zellen in diesem Bereich Fruchtklappenrandzellen-Merkmale (ROEDER *et al.* 2003). Werden zusätzlich die *SHP*-Gene ausgeknockt (*rpl, shp1,2* Tripel-Mutante), so bewirkt dies wiederum die Ausbildung eines normal gestalteten Replums. Demnach ist *RPL* nicht direkt für die Ausbildung des Replums verantwortlich, sondern fungiert vielmehr als Repressor der *SHP*-Gene, die zu einer fehlerhaften Ausbildung des Replums führen würden (ROEDER *et al.* 2003; ROEDER & YANOFSKY 2006).

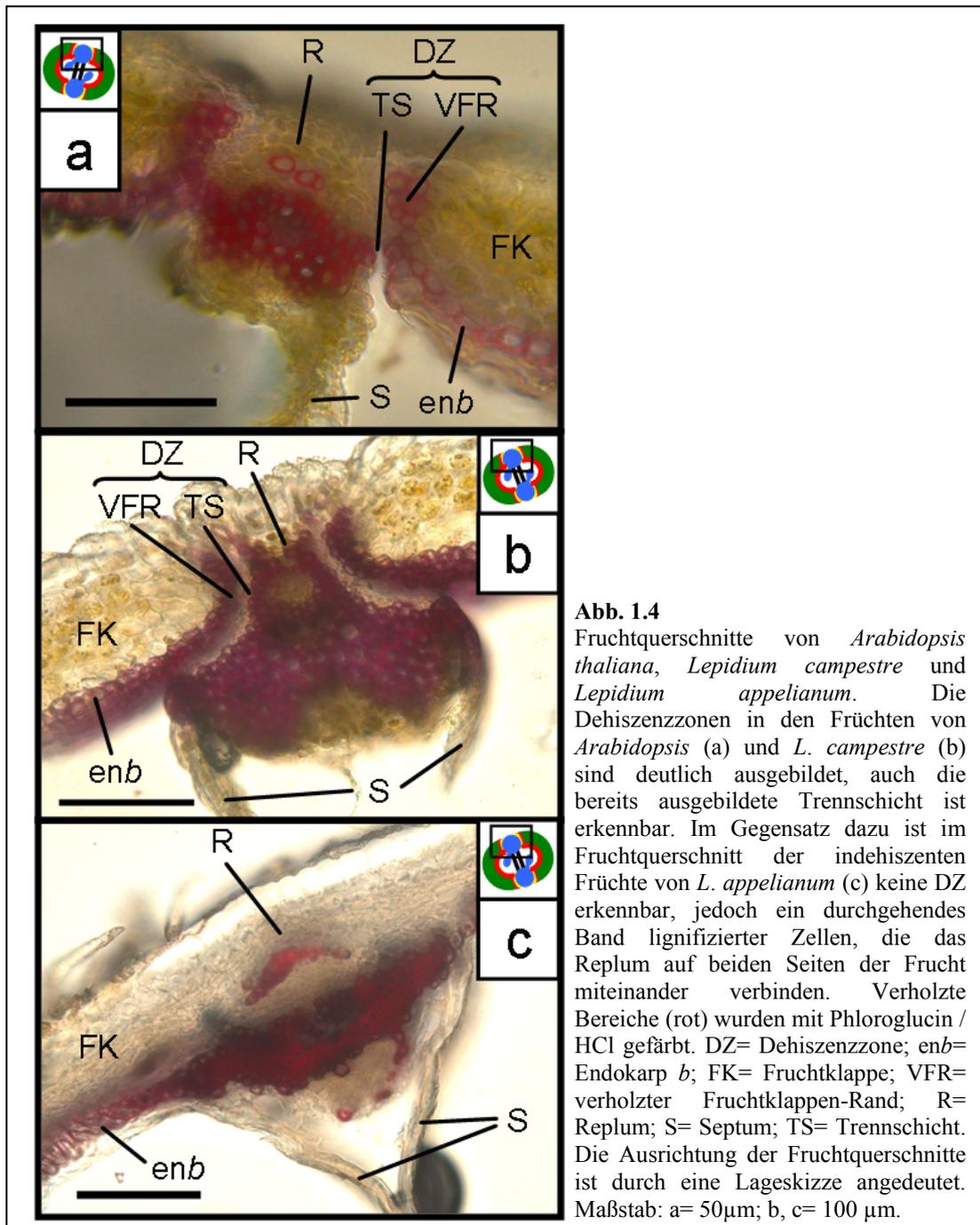
Die Funktion von *FUL* wurde anhand von *ful*-Mutanten nachgewiesen. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die Expression von *IND* auf die gesamte Fruchtklappe ausgeweitet war (LILJEGREN *et al.* 2004), was zu komplett verholzten Fruchtklappen führte. Ebenso konnte der Einfluss von *FUL* auf die *SHP*-Gene

nachgewiesen werden. In *35S::FUL*-Mutanten ist keine *SHP*-Expression in den Dehiszenzzonen erkennbar, *ful* knockout-Mutanten hingegen zeigen eine ektopische Expression der *SHP*-Gene im gesamten Fruchtklappenbereich (FERRANDIZ *et al.* 2000).



### 1.5 Fruchtanatomie in *Lepidium*

Bei anatomischen Voruntersuchungen der betrachteten *Lepidium*-Schwesterarten konnten interessante Parallelen zum *Arabidopsis*-Mutanten-System gefunden werden. Auf anatomischer Ebene konnte für die Öffnungsfrüchte produzierende Art *L. campestre* eine zu *Arabidopsis* Wildtyp-Früchten ganz ähnliche Anatomie nachgewiesen werden (Abb. 1.4). Eine Dehiszenzzone ist hier ebenso deutlich erkennbar, wie die bereits einsetzende Ausbildung einer Trennschicht (FERRANDIZ 2002; POLSTER 2005; MUMMENHOFF *et al.* 2009). Dies lässt eine ähnliche genetische Regulation zwischen *Lepidium campestre* und *Arabidopsis* vermuten.



Die Fruchtanatomie der Schließfrüchte von *L. appelianum* weicht von der in *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Früchten ab. So sind in Früchten von *L. appelianum* keine verholzten Fruchtklappenrandzellen ausgebildet, auch eine Dehiszenzzone sucht man vergebens (**Abb. 1.4**). Stattdessen ist ein durchgehendes Band verholzter Zellen erkennbar, die das Replum auf beiden Seiten der Frucht miteinander verbinden (POLSTER 2005; MUMMENHOFF *et al.* 2009). Diese Fruchtanatomie folgt nicht der des *Arabidopsis* Wildtyps, sondern vielmehr der unterschiedlicher *Arabidopsis* Mutanten

(z.B. *ind* oder *ind/alc* Mutanten) wobei unterschiedliche Mutationen zu ähnlichen indehiszenten Frucht-Phänotypen führten (FERRANDIZ *et al.* 2000; LILJEGREN *et al.* 2000; RAJANI & SUNDARESAN 2001; ROEDER *et al.* 2003; LILJEGREN *et al.* 2004; MUMMENHOFF *et al.* 2009).

## 1.6 Genfamilien der untersuchten Fruchtentwicklungsgene

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fruchtentwicklungsgenen handelt es sich durchweg um Transkriptionsfaktoren, welche zu unterschiedlichen Gen-Familien zugehörig sind. Um einen Überblick über die betreffenden Genfamilien zu geben, sollen diese hier kurz vorgestellt werden.

### 1.6.1 MADS-Box Genfamilie (*FUL*, *SHP1*, *SHP2*)

Die Familie der MADS-Box Gene umfasst eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren, die vor allem bei der Infloreszenz- und Blütenentwicklung eine wichtige Rolle spielen. So ist eine Vielzahl von MADS-Box Genen während der Evolution für verschiedenste regulatorische Pathways herangezogen worden, die heute unter anderem an der Entwicklung von Reproduktionsorganen beteiligt sind (SCHWARZ-SOMMER *et al.* 1990; YANOFSKY *et al.* 1990; DOYLE 1994; PURUGGANAN *et al.* 1995; ROUNSLEY *et al.* 1995; SAVIDGE *et al.* 1995; THEISSEN *et al.* 1996; COLOMBO *et al.* 2010).

Die Bezeichnung dieser Genfamilie ist angelehnt an die ersten bekannten MADS-Box Gene: *MCMI* (aus der Backhefe *Saccharomyces cerevisiae*), *AG* (*AGAMOUS* aus *Arabidopsis thaliana*), *DEF* (*DEFICIENS* aus *Antirrhinum majus*) sowie *SRF* (*Serum Response Factor* aus *Homo sapiens*) (SCHWARZ-SOMMER *et al.* 1990). Die Bedeutung der MADS-Box Gene an der Entwicklung von Fortpflanzungsorganen wird vor allem deutlich, wenn man die Anzahl der MADS-Box Gene verschiedener Pflanzengruppen betrachtet. So sind in Angiospermen mit ihren komplexen und hoch entwickelten Blüten mindestens 12 MADS-Box Gene zu finden, in einzelnen Pflanzen konnten bis zu 120 MADS-Box Gene nachgewiesen werden. Damit ist deren Zahl in den Angiospermen deutlich höher als dies der Fall bei Gymnospermen ist (mindestens 8 MADS-Box Gene; (MELZER *et al.* 2010)), die überwiegend windbestäubt sind und auf die Ausbildung eines komplexen Schauapparates verzichten können. Bei den Angiospermen etwa sind allein für die Ausbildung der Blüten und bis zur Weiterentwicklung der Frucht eine ganze Reihe von MADS-Box Genen beteiligt

(*AG*, *FUL*, *SHP1,2*, *SEP1,2,3*, *API*, *AP3*, *PI*). Hierbei spielt die Abfolge der Expression der einzelnen MADS-Box Gene bei der Entwicklung der verschiedenen Blütenorgane eine entscheidende Rolle. So besteht die Blüte von *Arabidopsis thaliana* aus vier Wirteln (Sepalen, Petalen, Stamina, Karpelle). Die Ausbildung dieser verschiedenen Blütenorgane wird durch mehrere MADS-Box Gene gesteuert, wobei das Zusammenwirken der verschiedenen Gene (ABC-Modell) entscheidend für die Ausbildung des jeweiligen Organs ist (BOWMAN *et al.* 1991; COEN & MEYEROWITZ 1991; MEYEROWITZ *et al.* 1991; WEIGEL & MEYEROWITZ 1994).

Innerhalb der Bryophyten (*Marchantia polymorpha*: derzeit ein bekanntes MADS-Box Gen, *Funaria hygrometrica*: elf MADS-Box Gene; (ZOBELL *et al.* 2010)) sowie der Grünalgen (*Chlamydomonas*: zwei MADS-Box Gene; (RIANO-PACHON *et al.* 2008)), die keine Blüten entwickeln, ist die Anzahl der MADS-Box Gene deutlich geringer (THEISSEN *et al.* 2000; THEISSEN 2001). Jedoch lässt die Tatsache, dass bereits *Physcomitrella patens* sowohl MADS-Box Gene als auch Homöobox Gene besitzt, darauf schließen, dass der letzte gemeinsame Vorfahre von Moosen und Gefäßpflanzen vor gut 400 Millionen Jahren – also dem Zeitpunkt deren Aufspaltung – bereits Homologe der Gene besaß, die heute die Entwicklung der Blüten- und Fruchtentwicklung, des Apikalmeristems sowie viele weitere Ontogeneseprozesse steuern - wahrscheinlich jedoch keine Orthologen dieser regulatorischen Gene beinhaltete (THEISSEN *et al.* 2001).

MADS-Box Gene bestehen aus einer Namen gebenden, ca. 60 Aminosäuren langen MADS-Domäne und binden als Dimere an spezielle Erkennungssequenzen in den Promotorregionen ihrer Zielgene, sogenannter CArG-Boxen (CC-(A/T)<sub>6</sub>-GG) (SCHWARZ-SOMMER *et al.* 1992; SHORE & SHARROCKS 1995), wobei die Affinität der Proteinbindung an unterschiedliche CArG-Boxen von der exakten Proteinsequenz abhängt (HUANG *et al.* 1996; WEST *et al.* 1998). An die MADS-Domäne schließen sich eine Intervening- sowie eine Keratin-Domäne an, welche gemeinsam für die Dimerbildung verantwortlich sind. Die C-terminale Domäne der MADS-Box Proteine (C-Domäne) ist die am wenigsten konservierte, was sowohl Länge als auch Sequenzvariabilität angeht. Die Aufgabe der C-Domäne besteht darin, je zwei Proteindimere miteinander zu verbinden und komplexe Quartett-Strukturen zu vermitteln (HONMA & GOTO 2001; KAUFMANN *et al.* 2005).

MADS-Box Gene werden in Typ I und Typ II Gene unterteilt, beide Gen-Typen haben bereits vor der Aufspaltung von Pflanzen, Tieren und Pilzen existiert (ALVAREZ-BUYLLA *et al.* 2000). Der Unterschied der beiden Typen liegt insbesondere in der fehlenden K-Domäne der Typ I Gene. Typ II Gene spalten sich wiederum in zwei Gruppen auf, die MIKC<sup>C</sup>-Typ sowie die MIKC<sup>\*</sup>-Gene. Einziger Unterschied dieser Untergruppen ist die Existenz von Introns außerhalb der I-Domäne auf genomischer Ebene bei den MIKC<sup>\*</sup>-Genen (HENSCHERL *et al.* 2002).

Wiederholte Genduplikationen führten zu der Fülle an MADS-Box Genen, wie sie heute bei den Spermatophyten bekannt ist (THEISSEN *et al.* 1996; KRAMER *et al.* 1998). Dabei entwickelten sich jedoch nach Duplikationsereignissen unterschiedliche Funktionen in den resultierenden Genen. So sind die Funktionen von *AGAMOUS* (*Arabidopsis*) und *PLENA* (*Antirrhinum majus*) sehr ähnlich, sie sind beide für die Entwicklung der Reproduktionsorgane essentiell (BRADLEY *et al.* 1993; MANDEL & YANOFSKY 1995). Phylogenetische Analysen zeigen jedoch, dass es sich bei diesen Genen nicht um orthologe Gene handelt. Die zugehörigen Orthologen sind vielmehr *FARINELLI* (*Antirrhinum majus*) und die *SHATTERPROOF*-Gene (*Arabidopsis*), die unabhängig voneinander eine Subfunktionalisierung durch Änderung von Regulation und Proteinfunktion durchlaufen haben (CAUSIER *et al.* 2005).

### 1.6.2 bHLH Genfamilie (*IND*, *ALC*)

Im Jahr 1989 wurde in verschiedenen Genen von Tieren ein Bereich mit einer signifikanten Anzahl gleicher Aminosäuren identifiziert, der heute als basic Helix-loop-Helix Domäne bezeichnet wird (MURRE *et al.* 1989). Die Isolation eines Gens für die Anthocyan-Biosynthese in *Zea mays* (*Lc*) sowie die Entdeckung von *PHO4* in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) legte den Schluss nahe, dass es sich bei der Genfamilie der bHLH-Transkriptionsfaktoren um eine in den Eukaryoten weit verbreitete Genfamilie handelt (LUDWIG *et al.* 1989; BERBEN *et al.* 1990). Üblicherweise sind am N-terminalen Ende der bHLH-Domäne 18 hydrophile und basische Aminosäuren lokalisiert (basic), an die sich zwei amphipatische Helices anschließen, die von einem Loop variabler Länge unterbrochen werden (MURRE *et al.* 1989; MURRE *et al.* 1994; ATCHLEY & FITCH 1997). Die Helix-Loop-Helix Struktur wird bei Säugetieren zur Dimerisierung zweier Proteine benötigt (FERRÉ-D'AMARÉ *et al.* 1993; ELLENBERGER *et al.* 1994; FERRÉ-D'AMARÉ *et al.* 1994). Bei Pflanzen fungieren einige, jedoch nicht alle der untersuchten bHLH-Gene als

Transkriptionsfaktoren (HEIM *et al.* 2003). Bei der Regulation verschiedenster Entwicklungsprozesse interagieren bHLH Gene in Pflanzen mit Transkriptionsfaktoren anderer Genfamilien. So interagiert bei der Trichomentwicklung in *Arabidopsis* das bHLH Protein GLABRA3 (*GL3*) mit dem R2R3-MYB Protein GLABROUS1 (*GL1*) (PAYNE *et al.* 2000). Ein weiteres bHLH Gen, der Phytochrom interacting factor 3 (*PIF3*) ist relevant für light signaling, vermittelt durch das Phytochrom B (NI *et al.* 1998). Hierbei binden die bHLH Proteine an DNA-Erkennungssequenzen (E-Box) mit der Konsensus-Sequenz CANNTG. Dabei gibt es jedoch unterschiedliche E-Boxen (ROBINSON *et al.* 2000), und auch benachbarte Nukleotide dieser Erkennungssequenzen können zur spezifischen Protein-DNA-Bindung beitragen (LITTLEWOOD & EVAN 1998; ATCHLEY *et al.* 1999; MASSARI & MURRE 2000; TOLEDO-ORTIZ *et al.* 2003).

Eine bedeutsame Funktion kommt den bHLH Genen bei der gewebespezifischen Insulinproduktion bei Säugetieren zu. NAYA *et al.* (1995) konnten zeigen, dass ein lokal in den Pankreaszellen vorliegendes bHLH Protein, BETA2, als Heterodimer mit dem ubiquitär vorliegenden bHLH Faktor E47 an die E-Box des Insulins bindet und so die Insulinproduktion reguliert.

Auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genen *INDEHISCENT* und *ALCATRAZ* handelt es sich um bHLH Gene, beide fungieren als Transkriptionsfaktoren (RAJANI & SUNDARESAN 2001; LILJEGREN *et al.* 2004). Insgesamt konnten im Genom von *Arabidopsis thaliana* 147 bHLH Gene identifiziert werden, wobei die großen Sequenz-Unterschiede außerhalb der bHLH-Domäne auffällig sind (TOLEDO-ORTIZ *et al.* 2003).

### 1.6.3 Superfamilie der Homöobox-Gene (*RPL*)

Die Familie der Homöobox-Gene umfasst eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren, die in eukaryotischen Lebewesen wichtige regulatorische Funktionen besitzen. Es handelt sich um eine große Genfamilie, die bereits vor der Trennung von Tieren, Pflanzen und Pilzen existiert hat und die bis heute eine konservierte Homöobox vereint. Die Homöobox-Gene besitzen eine aus 60 Aminosäuren bestehende, hoch konservierte DNA-Bindedomäne, die Homöodomäne (BÜRGLIN 1997), die aus drei  $\alpha$ -Helices besteht (GEHRING *et al.* 1990). Insbesondere der N-Terminus der Homöodomäne sowie die hoch konservierte dritte Helix sorgen für eine spezifische

Sequenzerkennung auf der Ziel-DNA (QIAN *et al.* 1989; KISSINGER *et al.* 1990; OTTING *et al.* 1990; LINCOLN *et al.* 1994).

Die TALE-Proteine besitzen allesamt eine „three amino loop extension“ zwischen der ersten und zweiten Helix der Homöodomäne (BERTOLINO *et al.* 1995) und spalten sich in acht Unterfamilien auf, welche sich wiederum durch verschiedene konservierte Bereiche auszeichnen. So unterscheidet man vier Gruppen innerhalb des Tierreiches (MEIS, PCB, IRO, TGIF), bei den Pilze werden zwei Gruppen voneinander unterschieden (M-ATYP, CUP) und auch innerhalb der Pflanzen gibt es zwei Unterfamilien (KNOX, BELL) (BÜRGLIN 1997). Die BELL-Homöobox Gene, zu denen auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gen *REPLUMLESS* zählt, zeichnen sich durch eine BELL-Domäne sowie das Fehlen einer ELK-Domäne aus, deren Auftreten auf die KNOX-Gene beschränkt ist (KERSTETTER *et al.* 1994; REISER *et al.* 1995).

Das erste aus dem Pflanzenreich isolierte und beschriebene Homöobox-Gen „*KNOTTED-1*“ aus *Zea mays* ist für die korrekte Ausgestaltung der Zellen verantwortlich (VOLLBRECHT *et al.* 1991), das Protein BELL1 aus *Arabidopsis* hingegen ist an der Entwicklung der Integumente und den Ovulen beteiligt (RAY *et al.* 1994; REISER *et al.* 1995; BELLAOUI *et al.* 2001). Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gen *REPLUMLESS* ist unter anderem an der korrekten Ausbildung der DZ beteiligt (vgl. 1.4), entscheidend für die Ausbildung des Replums selbst ist die Expression von *RPL* jedoch nicht (GIRIN *et al.* 2010). Diesem Gen, welches auch als *BELLRINGER* (*BLR*) bezeichnet wird, wird überdies eine Rolle bei der Phyllotaxis zugesprochen, der Ausbildung von Blütenknospen während der Infloreszenz-entwicklung (BYRNE *et al.* 2003; SMITH & HAKE 2003). RNAi und *blr*-Mutanten zeigen eine veränderte Phyllotaxis gegenüber dem Wildtypen, was sich in einer erhöhten Anzahl an Blättern und Blüten widerspiegelt.

Eine weite Verbreitung erfahren die Homöobox Gene auch im Tierreich, wo sie als HOX-Gene bezeichnet werden. Sie sind, ähnlich den MADS-Box Genen in Gefäßpflanzen, an einer ganzen Reihe von entwicklungsgenetischen Regulationen beteiligt. Ein bekannter Vertreter der Homöobox-Gene aus dem Tierreich ist das Gen *ANTENNAPEDIA* der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Dieses ist maßgeblich an der korrekten Entwicklung der unterschiedlichen Segmente von *Drosophila* beteiligt: so können loss-of-function-Mutanten statt des zweiten Beinpaars ektopisch Antennen ausbilden; gain-of-function-Mutanten hingegen besitzen überhaupt keine

Antennen, da diese Mutation zu einem weiteren Beinpaar führt (STRUHL 1981; SCHNEUWLY & GEHRING 1985; GEHRING 1987).

### 1.7 Fruchttöffnung in der Gattung *Aethionema* W.T. Aiton

Eine interessante und recht verbreitete Variante der Fruchttöffnungssysteme, bei denen verschiedene Strategien der Diasporenausbreitung miteinander kombiniert werden, hat sich zumindest in 18 Pflanzenfamilien entwickelt (IMBERT 2002). Bei dieser sogenannten Heterokarpie werden von einer Mutterpflanze unterschiedliche Fruchtformen hervorgebracht, teilweise innerhalb eines einzelnen Fruchtstandes, zumindest jedoch innerhalb des selben Individuums (ZOHARY 1937). Die Entwicklung von Heterokarpie ist zumeist bei annuellen Arten zu finden, überdies ist Heterokarpie sehr häufig in ariden Gebieten mit Wüsten- oder mediterranem Klima anzutreffen (ZOHARY 1937).

Heterokarpie tritt beispielsweise innerhalb der Asteraceen (*Calendula arvensis* (DE CLAVIJO 2005), verschiedenen *Leontodon*-Arten (IMBERT 2002)) oder innerhalb der Apiaceen auf (*Atriplex sagittata* mit drei verschiedenen Fruchtformen (MANDAK & HOLMANOVA 2004)). Unterschiedliche Fruchttypen findet man auch an dem Erdrauchgewächs *Ceratocarpus heterocarpa* Durieu, wobei hier zwischen „kurzen“, einsamigen Schließfrüchten und „längeren“, zweisamigen Öffnungsfrüchten unterschieden wird. Die unterschiedlichen Fruchtformen scheinen hierbei verschiedene Ausbreitungsstrategien zu verfolgen (DE CLAVIJO 1994). Eine generelle Anpassung (Öffnungsfrüchte → Anpassung an Ferntransport, Schließfrüchte → Verhinderung des Ferntransportes) kann dabei nicht festgestellt werden.

Innerhalb der Brassicaceen ist Heterokarpie in mehreren Gattungen zu finden, unter anderem in der Gattung *Aethionema* (IMBERT 2002). Die Gattung *Aethionema* beinhaltet mindestens drei Taxa, die als heterokarp gelten (*Ae. carneum* B. Fedtsch., *Ae. heterocarpum* J. Gay, *Ae. saxatile* W.T. Aiton (IMBERT 2002)) und sowohl Öffnungs- als auch Schließfrüchte innerhalb eines Fruchtstandes ausbilden. Die Öffnungsfrüchte treten dabei bevorzugt basal, die Schließfrüchte hingegen eher terminal an den Fruchtständen auf (ZOHARY 1937), was auch bei eigenen Nachzuchten beobachtet werden konnte. Aktuelle anatomische Untersuchungen von Öffnungs- und Schließfrüchten von *Ae. saxatile* legen den Schluss nahe, dass die Fruchttöffnung (bei Öffnungsfrüchten) ähnlich reguliert sein könnte wie in *Arabidopsis*, bei Schließfrüchten hingegen ist vielmehr eine Anatomie vorzufinden,

die mit verschiedenen *Arabidopsis*-Mutanten vergleichbar ist (MÜHLHAUSEN *et al.* 2008). Die Fruchtform einer weiteren Art, *Aethionema arabicum* Andr. ex DC., wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. So betrachten GRAF ZU SOLMS-LAUBACH (1901) und ZOHARY & FAHN (1950) *Ae. carneum* als heterokarp, in jüngerer Literatur wird diese Art nicht als heterokarp angesehen (IMBERT 2002).

## 1.8 Zielsetzung

Die Ziele dieser Arbeit sind zum einen die Isolation von Fruchtentwicklungsgenen aus *Lepidium campestre* mit dehiszenten Früchten sowie aus *Lepidium appelianum* mit indehiszenten Früchten (nachfolgend als „Kandidatengene“ bezeichnet) sowie deren molekulare Charakterisierung. Anhand phylogenetischer Analysen dieser isolierten Gene im Vergleich mit Fruchtentwicklungsgenen aus *Arabidopsis* sowie orthologen und paralogenen Genen anderer Gattungen und Familien sollen Aussagen zur Orthologie zu Fruchtentwicklungsgenen aus *Arabidopsis thaliana* getroffen werden. Geklärt werden soll, ob Fruchtentwicklungsgene in *Lepidium a priori* die gleiche Funktion übernehmen können wie in *Arabidopsis thaliana*.

Mit Hilfe raumzeitlicher Expressionsanalysen in Öffnungs- und Schließfrüchten sollen Unterschiede herausgearbeitet werden, anhand derer die Zahl der möglichen Kandidatengene minimiert werden kann. Sollte beispielsweise ein Gen in Öffnungsfrüchten andere Expressionsmuster zeigen als das möglicherweise Orthologe aus Schließfrüchten, so ließe dies Rückschlüsse auf Veränderungen in der genetischen Regulation (in Schließfrüchten) zu.

Diese Arbeiten sind notwendig, um geeignete Kandidatengene für eine nachfolgende Bearbeitungsperiode zu detektieren, mit denen schließlich heterologe Transformationsversuche unternommen werden sollen. Nur anhand dieser Funktionsanalysen mit Kandidatengenen können schließlich ultimative Aussagen darüber getroffen werden, welches Gen direkt an der Evolution indehiszenter Früchte in *L. appelianum* beteiligt ist. Überdies könnten die Ergebnisse – verglichen mit den Mutantensystemen aus *Arabidopsis thaliana* – helfen, die unabhängige Entstehung von Schließfrüchten innerhalb der verschiedenen Brassicaceen-Linien zu verstehen.

An der heterokarpen Art *Aethionema carneum* als weiteres Untersuchungsobjekt soll zunächst im Vergleich zu *Arabidopsis* Wildtyp- und Mutantenfrüchten die Anatomie

der Öffnungs- und Schließfrüchte analysiert werden. Für weiterführende Analysen sollen darüber hinaus erste Fruchtentwicklungsgene isoliert werden. Die Untersuchung der Fruchttöffnung an der heterokarpen Art *Aethionema carneum* auf genetischer Ebene soll die Evolution der Fruchttöffnung in den Brassicaceen näher beleuchten. Wie stark konserviert sind die Fruchttöffnungsmechanismen innerhalb der Brassicaceen und wie „einfach“ funktioniert das Umschalten bei der Entwicklung von Öffnungs- zu Schließfrüchten innerhalb eines Fruchtstandes bei heterokarpen Brassicaceen?

Das finale Ziel, nicht zuletzt auch der noch ausstehenden Untersuchungen, ist schließlich die Klärung der Frage: wie konserviert ist die genetische Regulation der Fruchttöffnung innerhalb der Brassicaceen (*Arabidopsis* – *Lepidium* – *Aethionema*) und welche Änderungen an der Regulation könnten innerhalb der verschiedenen Entwicklungslinien der Brassicaceen zu Schließfrüchten geführt haben.

Die Hauptziele dieser Arbeit – das Herausstellen eines oder weniger möglicher Kandidatengene – sind als unabdingbare Vorarbeiten für eine nachfolgende Bearbeitungsperiode zu betrachten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen der Fruchttöfnungsmechanismen wurden überwiegend bereits kultivierte Individuen von *Lepidium appelianum* (Schließfrüchte) mit den Akzessionsnummern Gaffri 43, 1291-2, 1292-4 sowie 1294-1 verwendet. Von der Öffnungsfrüchte entwickelnden Art *L. campestre* (L.) R.Br. (96-0070-30-00 sowie Nachzuchten davon) waren zunächst ebenfalls einige Individuen vorhanden. Da diese nicht wie *L. appelianum* ausdauernd sind (FRANCIS & WARWICK 2008), wurden im Laufe der Bearbeitung der oben beschriebenen Fragestellung weitere Individuen angezogen, um ausreichend Material für nachfolgende Versuche zur Verfügung zu haben. Die Kultur der Pflanzen erfolgte im klimatisierten Gewächshaus auf „Brassicaceen-Spezial“-Erde (vgl. 7.2).

Die Aufzucht der heterokarpen Art *Aethionema carneum* B. Fedtsch (KM1799) mit seinen Öffnungs- und Schließfrüchten innerhalb eines Fruchtstandes erwies sich als ungleich schwieriger. Nach einigen erfolglosen Anzuchtversuchen und der Überführung aus relativ feuchten Gewächshäusern in ein trockeneres Vegetationshallen-Klima im Botanischen Garten Osnabrück stellte sich auch bei *Aethionema carneum* die Blüte ein. Die genauen Herkunftsdaten sind in **Tabelle 2.1** angegeben.

### 2.2 Blühinduktion und Ernte von Blüten und Früchten

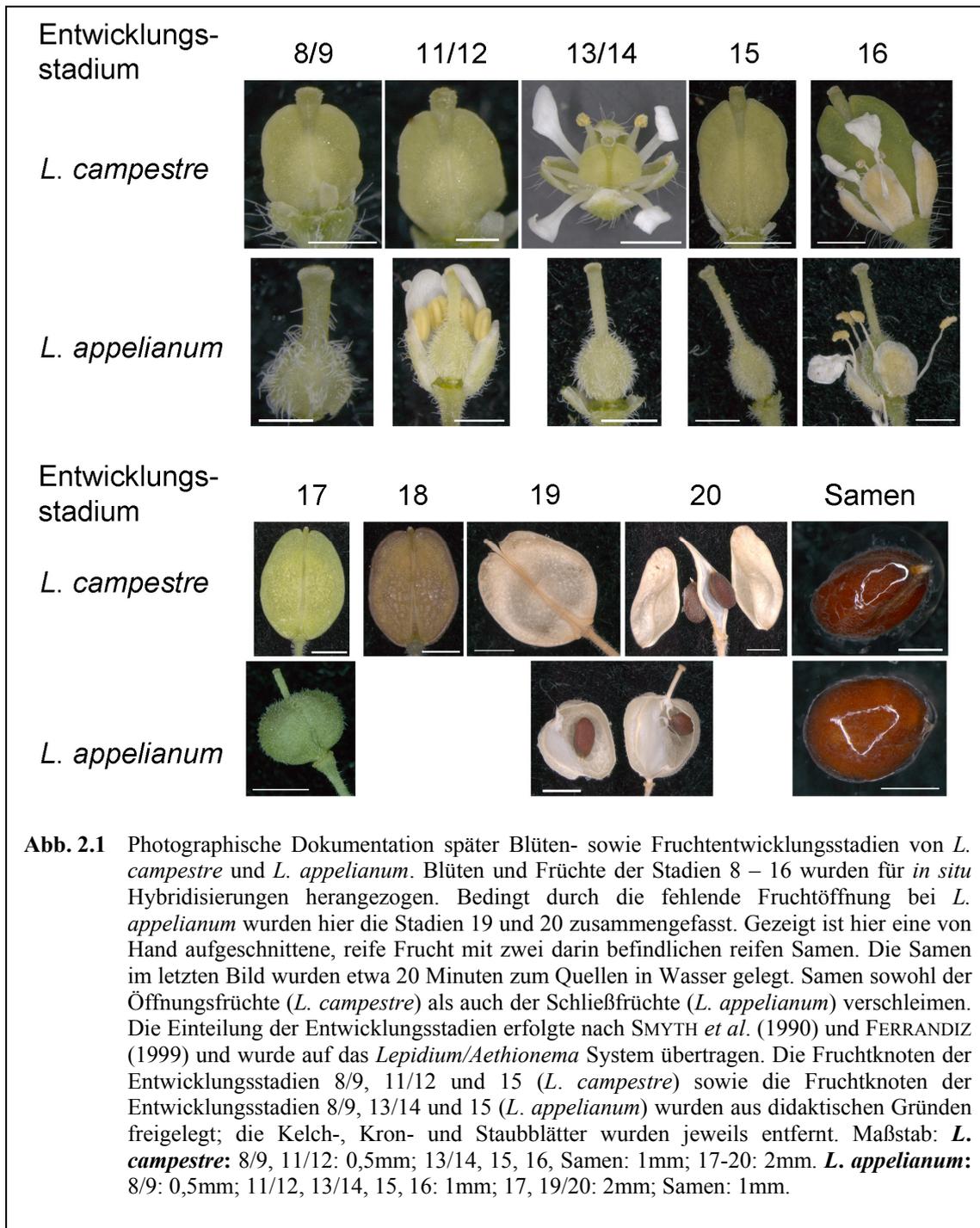
Pflanzen folgen einem Jahresrhythmus, um ihre Früchte in der Vegetationszeit eines Jahres zur Reife zu bringen. Damit sich die Ernte von Blüten- und Fruchtmaterial nicht ausschließlich auf die Frühsommermonate beschränkt, wurde ein künstlicher Winter simuliert. Es zeigte sich, dass *L. appelianum* am besten nach 13-wöchiger Kältebehandlung (4°C, 8h Licht) nach der Überführung ins Gewächshaus mit der Entwicklung von Blütenknospen begann, allerdings erst nach weiteren vier bis sechs Wochen (> 18°C, 16h Licht). Bei *L. campestre* reichte bereits eine Kältebehandlung von etwa 6-8 Wochen aus, nach der Überführung ins Gewächshaus erfolgte die Blütenentwicklung innerhalb einer Woche. *Aethionema carneum* beginnt als einjährige Pflanze bereits sehr bald zu blühen, so dass auf eine Kältebehandlung verzichtet wurde.

**Tabelle 2.1** Herkunftsdaten des verwendeten Pflanzenmaterials.

Taxon	interne Nummer	Sammler	Herkunft
<i>Lepidium campestre</i> (L.) R.Br.	96-0070-30-00	Index Seminum, 1995, Nr. 749, Berlin / Dahlem	Griechenland, Thrakien, Nomos Evros, Korimvos. 420m ü. NN.
<i>Lepidium appelianum</i> Al-Shehbaz	Gaffri 43	Mark Gaffri	USA: Wyoming, Sweetwater County, Route 191, 25 Meilen nördlich von Rocksprings
<i>Lepidium appelianum</i> Al-Shehbaz	1291-2	Mark Gaffri	Armenien: Feldrand an Straße 2km oberhalb Eraskh Richtung Germuk 900m ü. NN. 39.45N, 44.51E.
<i>Lepidium appelianum</i> Al-Shehbaz	1292-4	Mark Gaffri	USA. Wyoming. Fish & Game 528 Adams Laramie, Albany
<i>Lepidium appelianum</i> Al-Shehbaz	1294-1	Mark Gaffri	USA. Nevada. Nördlich von Carson City, Storey, 1440m ü. NN.
<i>Aethionema carneum</i> B. Fedtsch	KM1799	H. Moazzeni <i>et al.</i> 1048	Iran, Prov. Theran, Shahrestanak, 2000m ü. NN. 35°58'N, 51°21'E.

Im Zeitraum um den Blühbeginn wurden komplette Blütenstände (nachfolgend als „Knospen“ bezeichnet), Blütenknospen der Entwicklungsstadien ~8/9 und ~11/12, sowie Früchte der Entwicklungsstadien 13/14, 15 und 16 geerntet und bei -80°C gelagert (SMYTH *et al.* 1990; FERRANDIZ *et al.* 1999). Geerntete Blüten und Früchte für die *in situ* Hybridisierungsversuche wurden in unterschiedliche Fixierungsmedien überführt (vgl. 2.7.2.1).

Die Einteilung der verwendeten Früchte in Entwicklungsstadien erfolgte nach SMYTH *et al.* (1990) und FERRANDIZ (1999). Die Entwicklungsstadien beider *Lepidium*-Arten ab Stadium 8 sind in **Abb. 2.1** gezeigt. Der Vollständigkeit halber sind auch spätere Reifestadien bis zur reifen Frucht angegeben, die für Expressionsanalysen jedoch nicht berücksichtigt wurden.



### 2.3 Isolation von genomischer DNA (DOYLE & DOYLE 1987)

Zur Isolation von genomischer DNA wurde etwa 1g frisches Blattmaterial eingesetzt. Das Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 7 ml CTAB-Puffer versetzt und in 15 ml Greiner-Röhrchen (Roth, Karlsruhe) überführt. Das kationische Tensid CTAB fungiert als Komplexbildner für störende Proteine und sekundäre

Pflanzeninhaltsstoffe (wie etwa Polysaccharide), die so aus dem Isolationsgemisch beseitigt wurden.

Alle nachfolgenden Schritte wurden - mit Ausnahme der Zentrifugationsschritte - unter dem Abzug durchgeführt. Das DNA-Isolationsgemisch wurde mit 60µl β-Mercaptoethanol versehen und unter Rotation inkubiert (60°C, 1 h). Im Anschluss wurde ½ Volumen Chloroform zugegeben und erneut unter Rotation inkubiert (RT, 15 min). Während dieser organischen Extraktion wurden wasserlösliche DNA-Fragmente in der wässrigen Phase gelöst, Proteine und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe hingegen in der organischen Phase akkumuliert. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 10 min) und Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte die zweite organische Extraktion durch erneute Zugabe von ½ Volumen Chloroform. Die DNA wurde, nach wiederholter Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, gefällt (0,7 Vol-% Isopropanol, 30 min, auf Eis) und durch Zentrifugation pelletiert (RT, 12.000 x g, 30 min). Nach Waschen mit 70% EtOH (v/v) und Trocknen der Pellets wurden diese in 50-200µl dH<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.4 Isolation von total-RNA**

Das Isolieren von Kandidatengenomen für deren Charakterisierung sowie für die Herstellung von RNA-Sonden (*in vitro* Transkription) für *in situ* Hybridisierung sowie für Northern Blot Analysen ist eine essentielle Methode der vorliegenden Arbeit. Unerlässlich ist es hierbei, dass man die zu isolierende RNA sehr sorgsam behandelt, um die Degradation durch Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Vor RNA-Isolationen wurden die Arbeitsflächen stets mit RNase AWAY® (Roth, Karlsruhe) gereinigt.

Die Isolation von total-RNA erfolgte mit der RNA-Isolutionslösung RNAiso-G+ (segenetic, Borken). Es handelt sich dabei um eine „one-step-solution“ mit Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Die Methode erlaubt die Trennung unterschiedlicher pflanzlicher Inhaltsstoffe wie Nukleinsäuren und Proteine. Das chaotrope Guanidinisothiocyanat wirkt dabei denaturierend auf Proteine, indem es Wasserstoffbrückenbindungen auflöst. So werden bereits während der Homogenisierung RNasen entfernt, die die Ziel-RNA zerstören könnten.

Nach ontogenetischen Stadien getrennt (SMYTH *et al.* 1990; FERRANDIZ *et al.* 1999) wurden je 100mg Pflanzenmaterial, im vorgekühlten Mörser zerkleinert und mit 1 ml

RNAiso-G+ versetzt. Nach Inkubation bei RT (5 min) wurde den Proben 200ml Chloroform zugesetzt und das Gemisch gevortext (10 sek).

Die Extraktion mit Phenol und Chloroform löst Proteine in der organischen Phase, wohingegen in der wässrigen Phase die RNA akkumuliert. Die zweifelsohne auch vorhandene DNA befindet sich in einer Zwischenschicht zwischen wässriger und organischer Phase und lässt sich durch penibles Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß komplett entfernen. Die Phasentrennung erfolgte auf Eis (10 min) sowie anschließende Zentrifugation (15 min, 12.000 x g bei 4°C). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wo die RNA unter Zugabe des gleichen Volumenanteils Isopropanol gefällt wurde (30 min auf Eis, 30 min Zentrifugation 12.000 x g, 4°C). Nach Waschen (70% EtOH (v/v), mit DEPC angesetzt) und Trocknen der Pellets wurden diese in 30-100µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Qualitätsbestimmung erfolgte mittels Agarosegel, die Quantität wurde am Photometer (Omnilab, Bremen) photometrisch bestimmt. Für nachfolgende Versuche wurde mRNA benötigt, die in Gesamt-RNA zu etwa 5% enthalten ist (vgl. 2.5.2 ff.).

## 2.5 Isolation von Fruchtentwicklungsgenen

### 2.5.1 Primerdesign

Genspezifische Primer für die 3'RACE-Versuche wurden auf Basis der *Arabidopsis*-Gene sowie Orthologer dieser Gene aus anderen Gattungen gestaltet. Dabei wurde darauf geachtet, dass hoch konservierte Bereiche für das Primerdesign übergangen wurden, da sonst die Gefahr übermäßiger Kreuzhybridisierungen mit „falschen“ Genen bestand. Tatsächlich wurden bei den RACE-Versuchen neben den gesuchten auch diverse nicht gesuchte Gene gefunden, wie etwa in der 700bp-Bande von LcFUL in **Abb. 3.1**.

Primer für nachfolgende Arbeiten (5'RACE, Vollängenklone, Northern-, Southern- sowie *in situ* Hybridisierung) konnten auf Grundlage der aus der 3'RACE erzielten Ergebnisse abgeleitet werden. Die verwendeten Primer sind in **Tabelle 7.1** angegeben.

### 2.5.2 Reverse Transkription – cDNA-Synthese

Das Prinzip des „gene fishing“ ist sehr einfach, man bedient sich dabei natürlicher Umstände wie dem Poly(A)-Schwanz der mRNA.

Bis in die jüngere Vergangenheit ging man davon aus, dass der Informationsfluss innerhalb einer Zelle immer nur in eine Richtung abläuft: DNA → RNA → Protein; eine Umkehr – vom Protein zur RNA bzw. von der RNA zur DNA wurde ausgeschlossen. Mit der zeitgleichen Entdeckung der Reversen Transkriptasen, welche in RNA-Viren vorkommen und von diesen zum Umschreiben ihres Erbgutes in DNA benötigt werden (BALTIMOR 1970; TEMIN & MIZUTANI 1970), konnte dieses 'Dogma der Molekularbiologie' verbannt werden (COFFIN *et al.* 1997).

Für die Initialisierung der cDNA-Synthese nutzt man die bei allen eukaryotischen Genen vorhandene Polyadenylierung am 3'-Ende der mRNA. Hierbei handelt es sich um eine posttranskriptionale Modifikation eukaryotischer prä-RNA, ähnlich dem Splicing oder dem Capping am 5'-Ende von mRNA. Bei der reversen Transkription verwendet man einen Oligo-(dT)-Primer (AB05) mit einem Oligo-d(T)-Schwanz, der an den Poly(A)-Schwanz der mRNA bindet. Zusätzlich besitzt der Primer eine bekannte Sequenz an seinem 5'-Ende, die in der anschließenden Amplifikation als Primer-Bindestelle fungiert. Die reverse Transkription für 3'RACE-Versuche erfolgte mit einer reversen Transkriptase der Firma Fermentas (St. Leon-Rot).

#### cDNA-Synthese-Ansatz:

1,0 µg	Gesamt-RNA (variierendes Volumen)
6,5 µl	Primer AB05
x µl	dH <sub>2</sub> O
<hr/>	
13,0 µl	Gesamtansatz
→	Inkubation: 10 min, 60°C
	anschließend: Lagerung auf Eis
4,0 µl	5 x Transkriptionspuffer
0,5 µl	RNase Inhibitor
2,0 µl	dNTPs
0,5 µl	Reverse Transkriptase (10U)
→	Inkubation: 60 min, 42°C
→	Stoppen der Reaktion: 5 min, 85°C

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.5.3 3'RACE

Mit der 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) ist es möglich, unbekannte 3'-Enden verschiedener cDNA-Templates zu amplifizieren. Im Idealfall erhält man nur ein Produkt, welches das vermutete Gen enthält. Die 3'RACE wurde mit 1 µl cDNA angesetzt. In einigen Fällen wurde die cDNA in einer 1:20 Verdünnung verwendet. Alle RACE-Versuche wurden mit der Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo/Finnland) durchgeführt, einer Proofreading-Polymerase mit einer durchschnittlichen Fehlerrate von  $4,4 \times 10^{-7}$  (was einem Fehler je ~ 2,27 Mio. Basen entspricht).

3'RACE Ansatz:

1,0 µl	Template (cDNA)
10,0 µl	5 x Phusion Buffer
4,0 µl	dNTPs
2,5 µl	Primer (AB07), 5pmol
2,5 µl	Primer (SP), 5pmol
0,3 µl	Phusion™ Polymerase
29,7 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Annealingtemperaturen der verwendeten Primer sind im Anhang angegeben. Die Amplifikation dauerte 35 Zyklen, der ein initiierender Denaturierungsschritt von 98°C (30 sek) vorausging.

Das Phusion™-Amplifikationsprogramm verlief wie nachfolgend angegeben. Bei sehr langen Vollängenklonen (vgl. **2.5.8**) wurde die Elongationszeit bis auf eine Minute verlängert.

1.	initiale Denaturierung	30 s	→	98°C		34 x
2.	Denaturieren	10 s	→	98°C		
3.	Annealing	10 s	→	variabel		
4.	Elongation	30 s	→	72°C		
5.	Elongation	5 min	→	72°C		

Die Kontrolle der Amplifikation erfolgte im Agarosegel.

**2.5.4 Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel**

PCR-Produkte wurden mit 5x Gel-Ladepuffer versetzt und im 1%-igen Agarosegel (in 1 x TBE) aufgetrennt. Sollte eine Gelextraktion folgen, so wurde der komplette Amplifikationsansatz auf das Gel aufgetragen. Ein zusätzlich aufgetragener Größenstandard ermöglichte die Abschätzung der Größe der PCR-Produkte. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80-130 V.

Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurde von jedem Gel ein digitales Foto erstellt.

**2.5.5 Gelaufreinigung**

Für nachfolgende Klonierungen (vgl. **2.5.6**) mit den PCR-Produkten aus der 3'- bzw. 5'-RACE erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Agarosegel. Hierfür kam das „NucleoSpin Extract II“ (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben zum Einsatz. Die Elution der PCR-Produkte erfolgte in 25-50µl dH<sub>2</sub>O, anschließend wurde der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt.

## 2.5.6 Klonieren

### 2.5.6.1 A-tailing

Die Phusion™ Polymerase produziert „blunt end“ PCR-Produkte, die nicht direkt mit bestimmten Vektoren (pGEM-T, Promega, Mannheim; pCR 2.1®, Invitrogen, Karlsruhe) in Ligationsreaktionen eingesetzt werden konnten, da diese Vektoren 5'-Thymin-Überhänge besitzen. Vor der Ligation mussten die PCR-Produkte daher mit einen 3'-Adenin-Überhang versehen werden. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Vektorsysteme verwendet (vgl. 7.4).

#### A-tailing:

3,0 µl	PCR-Produkt
1,0 µl	10 x Reaktionspuffer
0,8 µl	dATP
1,0 µl	Taq-Polymerase
3,2 µl	dH <sub>2</sub> O

Der Einbau der 3'-Adenosin-Überhänge wurde durch eine Taq-Polymerase katalysiert. Die so veränderten PCR-Produkte konnten direkt in der nachfolgenden Ligation verwendet werden.

### 2.5.6.2 Ligation

Es gibt verschiedene Vektorsysteme, die für unterschiedliche Anwendungen und Fragestellungen angewandt werden. So sind low- und high-copy Plasmide verfügbar, die in nur wenigen (10-30) oder in sehr vielen Kopien (bis 300) je Zelle vorliegen. Je nach Anwendung wird ein Vektorensystem gewählt, mit dem die gewünschten Versuchsziele zu erreichen sind. Klonierungsversuche dienen primär dazu, die gewünschten DNA-Fragmente der gesuchten Gene für spätere Sequenzierungen sowie für die Herstellung von Sonden für *in situ* Hybridisierungen (vgl. 2.7), Southern Blot (vgl. 2.8) sowie Northern Blot Analysen (vgl. 2.9) zu vervielfältigen.

Für die Bearbeitung der vorliegenden Fragestellungen wurde ein high-copy-Vektor ausgewählt (pGEM®-T Vector Systems I, Promega, Mannheim). Ziel der Ligation ist es, ein gewünschtes Insert (z.B. ein Kandidatengen) mit einem Vektor zu einem Plasmid zu verbinden. Mit diesen Plasmiden werden in einem nachfolgenden Schritt Bakterien transformiert, um möglichst viel Plasmidprodukt zu produzieren (vgl. 2.5.6.3).

Die eigentliche Ligationsreaktion wurde nach Herstellerangaben des verwendeten Vektors durchgeführt. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C.

### 2.5.6.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Das Prinzip der Transformation besteht darin, die genetische Information eines Organismus (hier: *Escherichia coli*) um ein bestimmtes DNA-Fragment (ein Plasmid) zu erweitern. Man bedient sich dabei der Tatsache, dass *E. coli* unter bestimmten Umständen in der Lage ist, Plasmid-DNA aufzunehmen. Plasmide können nach den Bedürfnissen der Fragestellung hergestellt werden und besitzen meist mehrere Gene, die für eine spätere Selektion oder die Expression des Inserts benötigt werden. Überdies besitzen Plasmide meist eine Antibiotikum-Resistenz, die zu Selektionszwecken verwendet wird. Transformationsversuche wurden mit chemisch kompetenten Zellen (CH3-Blue, Bioline, Luckenwalde) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Ausstrich der transformierten Zellen auf LB Agar wurde bei 37°C über Nacht inkubiert; dem LB Agar wurde zuvor, X-Gal (100µg/ml, pGEM-T), IPTG (14,4µg/ml, pGEM-T) sowie Ampicillin (100µg/ml, pGEM-T bzw. pJET) zugegeben.

### 2.5.6.4 Restriktion und Colony-PCR

Zu Beginn der Arbeit wurden aus als positiv erkannten Kolonien zunächst Plasmide isoliert (vgl. 2.5.6.5), per Restriktion mit der Endonuklease EcoRI das Insert herausgeschnitten und das Ergebnis im Agarosegel betrachtet. Hierzu waren isolierte Plasmide nötig. Um jedoch die Kosten gering zu halten und nicht mit „falsch positiven“ Kolonien weiter zu arbeiten, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit vor den Plasmidisolationen eine Colony-PCR als Kontrolle von potentiell „positiven“ Kolonien durchgeführt. Stellte sich heraus, dass das Plasmid kein Insert der gewünschten Länge aufgenommen hatte, wurden die betreffenden Kolonien verworfen.

#### Reaktionsansatz Colony-PCR:

2,5 µl	10 x Reaktionspuffer
1,0 µl	dNTPs
1,25 µl	M13 Universalprimer fwd
1,25 µl	M13 Universalprimer rev
0,2 µl	Taq-Polymerase
18,8 µl	dH <sub>2</sub> O

Als Template dienten potentiell positive (weiße) Kolonien. Diese wurden mit einem sterilen Zahnstocher in den Amplifikationsansatz gegeben. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm:

1.	initiale Denaturierung	60 s	→	94°C
2.	Denaturieren	30 s	→	94°C
3.	Annealing	30 s	→	52°C
4.	Elongation	60 s	→	72°C
5.	Elongation	10 min	→	72°C



25 x

Die Kontrolle der Colony-PCR erfolgte per Agarosegel. Mit den positiven Kolonien, die das gewünschte Insert eingebaut haben, wurde weiter gearbeitet.

#### 2.5.6.5 Plasmid-Isolation

Die nach der Colony-PCR erfolgversprechenden Kolonien wurden erneut angepickt und in 4ml mit 4µl Ampicillin (100µg/µl) versetztem LB-Medium (LB Broth (Lennox), Roth, Karlsruhe) über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Plasmid-Isolation erfolgte mit dem „Nucleo Spin Extract Plasmid“ Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben. Die Elution der Plasmide erfolgte in 50µl dH<sub>2</sub>O.

#### 2.5.6.6 Sequenzierung und Auswertung

Die Inserts in den Plasmiden wurden sequenziert, damit die Ergebnisse bioinformatisch ausgewertet werden konnten (NCBI-Blast). Nur so war es möglich, Angaben zur Orthologie der Gene treffen zu können. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode nach SANGER et al. (1977) (verändert nach Applied Biosystems, Darmstadt).

##### Sequenzansatz:

1,5 µl	Template (Plasmid-DNA)
2,0 µl	Primer
2,0 µl	Ready-Reaction-Mix
4,5 µl	dH <sub>2</sub> O

Der verwendete Ready-Reaction-Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) beinhaltet alle benötigten dNTPs, einen speziellen Puffer für die Polymerase sowie Abbruchnukleotide, die an ihren 3'-C-Atomen statt mit einer OH-Gruppe mit unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen versehen sind. Nach Einbau eines solchen Abbruchnukleotids können nachfolgend keine weiteren Nukleotide eingebaut werden, es kommt zum Kettenabbruch.

##### Sequenzreaktion:

1.	initiale Denaturierung	60 s	→	96°C
2.	Denaturieren	30 s	→	96°C
3.	Annealing	15 s	→	50°C
4.	Elongation	4 min	→	60°C



30 x

Nach Fällung der Sequenzen (90µl H<sub>2</sub>O, 10µl 3M NaAc, 250µl 100% EtOH) wurden diese zur Auftrennung an den Sequenzierservice des Fachbereiches übergeben.

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programms BioEdit (HALL 1999) editiert und mit Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov, Nucleotide Blast) analysiert. Vielversprechende

Sequenzen wurden zudem für nachfolgende phylogenetische Analysen in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit dem Sequenzanalyseprogramm PAUP\* (SWOFFORD 2003) bearbeitet (vgl. 2.6 ff).

### 2.5.7 5'RACE

Mittels 3'RACE (2.5.2 - 2.5.6.6) ist es möglich, unbekannte 3'-Enden von bislang nicht bekannten Genen zu identifizieren. Für die Charakterisierung von Genen und für Downstream-Analysen ist es erforderlich, auch die 5'-Enden zu isolieren; so ist es möglich, z.B. bei *in situ* Hybridisierungen mit möglichst langen Sonden zu arbeiten. Für die 5'-RACE wurden mehrere auf Basis der Sequenzdaten der 3'-RACE entwickelte genspezifische Primer benötigt (SP). Einer dieser Primer (SP1, der dem 3'Ende am nächsten gelegene Primer) wurde nachfolgend für die spezifische cDNA-Synthese eingesetzt, um nur die mRNA des jeweiligen Kandidatengens zu transkribieren. Die reverse Transkription erfolgte wie unter 2.5.2 beschrieben, jedoch – mit einer thermostabilen Reversen Transkriptase – bei 65°C (Transcriptor Reverse Transcriptase; Roche, Mannheim). Die erhöhte Reaktionstemperatur verbesserte die Spezifität der reversen Transkription durch ein besseres Aufschmelzen von evtl. vorhandenen Sekundärstrukturen der Template RNA. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA mit DNA-Aufreinigungssäulen (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Um die gleichen Primer wie in der 3'RACE zu verwenden, erfolgte ein Poly(A)-tailing an die 3'-Enden der cDNA mittels des Enzyms TdT (Terminale desoxynucleotidyl Transferase, Fermentas, St. Leon-Roth).

#### Poly(A)-tailing:

10,0 µl	aufgereinigte cDNA
4,0 µl	TdT-Buffer
1,5 µl	dATP
1,5 µl	Terminale Desoxyribotransferase
3,0 µl	dH <sub>2</sub> O

Die Adenylierung (20 min, 37°C) wurde bei 70°C (10 min) gestoppt. Die so vorbereitete cDNA konnte für 5'RACE-Versuche verwendet werden, in denen als Primer sowohl der Oligo-d(t)-Primer (AB05) sowie ein genspezifischer Primer (SP2) verwendet wurden.

Mit 1µl des erhaltenen PCR-Produktes als Template sowie den Primern AB07 und einem weiteren spezifischen Primer (SP3) wurde eine „nested“ PCR durchgeführt.

Nach Gelextraktion der PCR-Produkte wurde mit diesen wie unter **2.5.6** bis **2.5.6.6** erläutert weiter verfahren.

### **2.5.8 Vollängenklone**

Die vollständige mRNA-Sequenz eines jeden Gens inklusive der 5'- und 3'-UTR wurde mit Hilfe hochspezifischer Primer amplifiziert, die am Beginn des 5'-Endes sowie am Ende des 3'-Endes greifen. Die Amplifikationsbedingungen entsprachen denen für die Phusion Polymerase (vgl. **2.5.3**). Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden in *E. coli* kloniert und dienten als Templates für die Sondenherstellung für *in situ*-, Southern- sowie Northern-Analysen (vgl. **2.7.3, 2.8, 2.9**).

### **2.5.9 Glycerinkulturen**

Einzelne Klone, welche das gewünschte Insert enthielten, wurden als Glycerinkultur bei -80°C gelagert, um bei einem späteren Bedarf auf den jeweiligen Klon zurückgreifen zu können. Hierzu wurden wiederum Übernacht-Kulturen angesetzt (4ml LB-Medium, 4µl Ampicillin) und mit den gewünschten *E.coli* Transformanten angeimpft. Tags darauf wurde 1ml der ÜN-Kultur mit 1 ml Glycerin gut vermischt und in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

## **2.6 Phylogenetische Analysen**

Ein wichtiges Kriterium dafür, ob es sich bei den Kandidatengen tatsächlich um orthologe Gene von *Arabidopsis* handelt, ist die Position der Kandidatengene in einem phylogenetischen Stammbaum, der neben den bekannten Fruchtentwicklungsgenen aus *Arabidopsis* auch paraloge und entfernter verwandte Gene der jeweiligen Genfamilie enthält. Anhand eines solchen Stammbaums erhält man Hinweise darauf, ob es sich tatsächlich um Orthologe der *Arabidopsis*-Fruchtentwicklungsgene und damit um mögliche Kandidatengene handelt und ob nachfolgende Untersuchungen mit diesen Genen Erfolg versprechend sind.

Für die phylogenetischen Analysen wurden in dieser Arbeit Genfamilien übergreifend 125 Gene für die MADS-Box Genphylogenie bzw. 28 BELL-Homöodomänen-Gene verwendet. Da das Alignieren auf Aminosäureebene erfahrungsgemäß deutlich bessere Ergebnisse bringt, wurden die DNA-Sequenzen zunächst in Aminosäuresequenzen übersetzt (SeaView 4.2.11 (GOUY *et al.* 2010)), automatisch aligniert (ClustalW2 (LARKIN *et al.* 2007)) und von Hand nacheditiert. Schließlich

wurde das Alignment mit dem Programm SeaView 4.2.11 in die originalen DNA-Sequenzen zurückübersetzt und konnte für nachfolgende Analysen verwendet werden.

Überdies wurden deutlich kleinere Datensätze erstellt, welche ausschließlich die bekannten Fruchtentwicklungsgene von *A. thaliana*, die potentiell orthologen Fruchtentwicklungsgene der zwei untersuchten *Lepidium*-Arten, sowie das möglicherweise orthologe Fruchtentwicklungsgen *SHP2* aus *Aethionema carneum* beinhalteten. Da diese Datensätze nur nah verwandte Gene beinhalteten, konnten wesentlich exaktere Alignments erstellt werden, weil es außerhalb der hoch konservierten Regionen (MADS-Domäne, BELL- / Homöodomäne) große Unterschiede zwischen den Genen der verschiedenen Unterfamilien gibt. Eine umfassende Aufstellung aller für die phylogenetischen Berechnungen verwendeten Gene ist in **Tabelle 2.2** gegeben.

### 2.6.1 Ermittlung von Sequenzhomologien

Zur Charakterisierung der Gen-Sequenzen wurden unter anderem Sequenzähnlichkeiten nach dem GTR-Substitutionsmodell (General Time Reversible Model) berechnet (RODRIGUEZ *et al.* 1990). Dieses Modell geht davon aus, dass alle Nukleotid-Substitutionen mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten möglich sind (KNOOP & MÜLLER 2006). Eine Gewichtung der dritten Codonpositionen bei der Bestimmung der Nukleotidhomologien wird bei diesem Modell nicht berücksichtigt. Die Berechnung von Nukleotidhomologien wurde mit dem Programm PAUP\* Version 4.08b (SWOFFORD 2003) durchgeführt. Aminosäure-Ähnlichkeiten und Aminosäure-Identität wurden mit dem Programm MatGat 2.01 durchgeführt (CAMPANELLA *et al.* 2003). Die auf DNA- und Aminosäureebene durchgeführten Berechnungen wurden mit den Alignments durchgeführt, die ausschließlich die relevanten Fruchtentwicklungsgene beinhalteten (vgl. 2.6).

### 2.6.2 Neighbor Joining Methode

Um einen schnellen Eindruck über die Position der Fruchtentwicklungsgene aus *Lepidium* in einem Stammbaum zu erlangen, wurden „Neighbor Joining“ Analysen durchgeführt (SAITOU & NEI 1987). Die Neighbor Joining Methode ist ein schnelles Verfahren zur Annäherung an den „Minimum-Evolution-Baum“ (KNOOP & MÜLLER 2006). Neighbor Joining Analysen wurden unter Verwendung der Voreinstellungen

auf Distanzbasis ebenfalls mit dem Programm PAUP\* erstellt. Sie basieren auf einer Distanzmatrix und beruhen nicht auf ultrametrischen Daten; es wird also keine molekulare Uhr bzw. keine konstante Evolutionsrate vorausgesetzt.

### **2.6.3 Bayesische Phylogenierekonstruktion**

Um stabile Stammbäume und Hinweise für die Orthologie der Kandidatengene zu erhalten, wurden Bayesische Phylogenierekonstruktionen verwendet. Hierfür wurden mittels Maximum Likelihood-Abschätzungen zunächst die besten Substitutionsmodelle für die jeweiligen Datensätze bestimmt (MrModeltest2 (NYLANDER 2004; POSADA 2008)). Die entsprechenden Befehle wurden anschließend in MrBayes, Version 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK 2003), implementiert.

Die Berechnungen erfolgten für die Dauer von 1 Million Generationen (BELL-Genfamilie) bzw. 1,7 Millionen Generationen (MADS-Box Genfamilie). In jeder Generation ermittelt MrBayes eine Topologie, von denen jede hundertste gespeichert wurde. Schließlich wurden die initialen 25% dieser Topologien verworfen (Burn-in), aus den verbliebenen Bäumen wurde je ein Strict-Consensus Baum ermittelt.

### **2.6.4 Bootstrap-Analyse**

Bootstrap-Analysen wurden zur statistischen Vertrauensabschätzung der Phylogenien durchgeführt (FELSENSTEIN 1985). Mit den während der 1000 Replikate gespeicherten MPTs (most parsimonious trees) wurden 50%-Majority-Rule-Bäume erstellt, in denen nur diejenigen Knoten angezeigt wurden, die in mindestens 50% aller MPTs auftauchten. Die Bewertung von Bootstrap-Daten ist nicht unumstritten; so gibt FELSENSTEIN (1985) erst Werte über 95% als statistisch gesichert an, andere Autoren vertrauen bereits Werten von über 70% (HILLIS & BULL 1993); Homoplasien bzw. zu wenige einen Knoten stützende informative Merkmale können niedrige Bootstrap-Werte verursachen. Die Bootstrap-Werte wurden anschließend auf die Knoten der bayesischen Phylogenie übertragen. Unabhängig vom Alter der Bootstrap-Methode ist diese weiterhin aktuell und wird auch in neuester Literatur weiterhin angewendet (KOCH *et al.* 2010; VIAENE *et al.* 2010; FAJARDO & SPOONER 2011).

**Tabelle 2.2** Auflistung der in phylogenetischen Rekonstruktionen verwendeten Gene sowie deren GenBank-Akzessionsnummern. Zunächst sind alle Brassicaceen-Gene alphabetisch aufgeführt, anschließend alle übrigen für die Phylogenien verwendeten Gene anderer Pflanzenfamilien, ebenfalls alphabetisch geordnet.

Art	Name	GenBank Nummer
<b>Brassicaceae</b>		
<i>Aethionema carneum</i> B.Fedtsch.	<i>FRUITFULL</i> <sup>1</sup>	FR727244
	<i>SHATTERPROOF2</i> <sup>1</sup>	FR727241
<i>Arabidopsis lyrata</i> (L.) O'Kane & Al-Shehbaz	<i>SEPALLATA1</i>	AY727598
	<i>SEPALLATA2</i>	AY727621
	<i>SHATTERPROOF1</i>	AY727645
	<i>SHATTERPROOF2</i>	AY727670
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>AGAMOUS</i>	AT4G18960
	<i>APETALA1</i>	AT1G69120
	<i>APETALA3</i>	AT3G54340
	<i>CAULIFLOWER</i>	AT1G26310
	<i>FRUITFULL</i>	AT5G60910
	<i>PISTILLATA</i>	AT5G20240
	<i>SEEDSTICK</i>	AT4G09960
	<i>SEPALLATA1</i>	AT5G15800
	<i>SEPALLATA2</i>	AT3G02310
	<i>SEPALLATA3</i>	AT1G24260
	<i>SEPALLATA4</i>	AT2G03710
	<i>SHATTERPROOF1</i>	AT3G58780
	<i>SHATTERPROOF2</i>	AT2G42830
	<i>BEL1</i>	AT5G41410
	<i>BLH1</i>	AT2G35940
	<i>BLH2</i>	AT4G36870
	<i>BLH3</i>	AT1G75410
	<i>BLH4</i>	AT2G23760
	<i>BLH5</i>	AT2G27220
	<i>BLH6</i>	AT4G34610
<i>BLH7</i>	AT2G16400	
<i>BLH8</i>	AT2G27990	
<i>BLH10</i>	AT1G19700	
<i>REPLUMLESS</i>	AT5G02030	
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.	<i>AGAMOUS</i>	DQ060334
<i>Brassica napus</i> L.	<i>FRUITFULL</i>	DQ414534
	<i>SHATTERPROOF1</i>	AF226865
	<i>SHATTERPROOF2</i> a	EU424342
	<i>SHATTERPROOF2</i> b	EU424343
<i>Brassica oleracea</i> L.	<i>FRUITFULL</i>	AJ505844
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik.	<i>AGAMOUS</i> -a	EU551772
	<i>SEEDSTICK</i> a	EU551766
	<i>SHATTERPROOF1</i> a	EU551770
	<i>SHATTERPROOF2</i> a	EU551768
<i>Capsella rubella</i> Reut.	<i>AGAMOUS</i> -like	AY277679
<i>Coronopus squamatus</i> (Forssk.) Asch.	<i>AGAMOUS</i> -like	AY277684
	<i>AGAMOUS</i> -like	AY277685
<i>Lepidium campestre</i> (L.) R. Br.	<i>FRUITFULL</i> <sup>1</sup>	FR727237
	<i>SHATTERPROOF1</i> <sup>1</sup>	FR727235
	<i>SHATTERPROOF2</i> <sup>1</sup>	FR727236
	<i>REPLUMLESS</i> <sup>1</sup>	FR727238
<i>Lepidium appelianum</i> Al-Shehbaz	<i>FRUITFULL</i> <sup>1</sup>	FR727231
	<i>SHATTERPROOF1</i> <sup>1</sup>	FR727229
	<i>SHATTERPROOF2</i> <sup>1</sup>	FR727230
	<i>REPLUMLESS</i> <sup>1</sup>	FR727232
<i>Lepidium phlebopetalum</i> F.Muell.	<i>AGAMOUS</i> -like	AY277686
<i>Sinapis alba</i> L.	<i>FRUITFULL</i>	U25695
<b>weitere Familien</b>		
<i>Antirrhinum majus</i> L.	<i>DEFICIENS</i>	X62810
	<i>DEHF7</i>	AJ311828
	<i>DEFH28</i>	AY040247
	<i>DEHF49</i>	AJ311828
	<i>DEFH68</i>	AJ311827
	<i>DEFH72</i>	X95468

## Fortsetzung Tabelle 2.2

Art	Name	GenBank Nummer	
<i>Antirrhinum majus</i> L.	DEFH200	X95469	
	FARINELLI	AJ239057	
	GLOBOSA	X68831	
	PLENA	S53900	
	SQUAMOSA	X63701	
<i>Carica papaya</i> L.	FRUITFULL	EU141967	
<i>Citrus unshiu</i> (Swingle) Marcow.	CitMADS6	AB218613	
<i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill	EGM3	AF029977	
<i>Gnetum gnemon</i> L.	GGM3	AJ132209	
	MELBEL1	AJ318871	
	MELBEL2	AJ318872	
<i>Hordeum vulgare</i> L.	BEL2 Bow	GQ853057	
	BEL2 Step	GQ853058	
<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	AGAMOUS	AF103903	
<i>Lolium perenne</i> L.	MADS16	DQ110011	
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	BL2	AF375966	
	MADS1	AY294329	
	TAG1	L26295	
	TAG2	AY098738	
	TAGL11	AY098736	
	TAGL12	AY09873	
	TM29	AJ302015	
<i>Malus x domestica</i> Baumg.	AG-like	AF401637	
	MADS10	AJ000762	
	MADS14	AJ251117	
	MADS15	AJ251118	
	MADS16	AB370212	
	MDH1	AF053769	
	PI	AJ291490	
<i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	PIM	DQ139345	
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	AG1	L23925	
	DEF	X96428	
	FUL	DQ534202	
	GLO	X67959	
	MADS4	AF068723	
	MADS5	AF068724	
	MADS11	AF385746	
	NAG1	L23925	
	MADS3	AF068722	
<i>Nicotiana glauca</i> L.	MADS3	AF068722	
	<i>Nicotiana glauca</i> L.	MADS3	AF068722
	<i>Oryza sativa</i> L.	OsMADS1	AF204063
	OsMADS5	U78890	
	OsMADS7	U78891	
	OsMADS8	U78892	
	OsMADS13	AF151693	
	MADS16	AF077760	
RMADS217	AY551922		
RPL	Os01g0848400		
<i>Petunia inflata</i> R.E.Fr.	AGL1	L33973	
	FBP1	M91190	
	FBP2	M91666	
	FBP4	AF335234	
	FBP5	AF335235	
	FBP6	X68675	
	FBP7	X81651	
	FBP9	AF335236	
	FBP11	X81852	
	FBP23	AF335241	
	FBP26	AF176783	
	MADS3	X72912	
	PFG	AF176782	
	PMADS1	DQ539416	
	PMADS2	X69947	
PMADS12	AY370527		
<i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp.	PPTIM4	XM_001775895	
	PPTIM5	XM_001775855	
<i>Pinus radiata</i> D. Don.	MADS	AF023615	
	SHPI-like	U42399	
<i>Pisum sativum</i> L.	MADS4	AF461740	

Fortsetzung Tabelle 2.2

Art	Name	GenBank Nummer
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.	<i>SHP</i> -like	DQ777635
	<i>SHP2</i>	EU072119
<i>Ricinus communis</i> L.	<i>BEL1</i>	XM_002529809
<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Bel13</i>	AF406699
	<i>Bel22</i>	AF406701
	<i>BIP</i>	EU352654
	<i>MADS16</i>	AY643733
<i>Spinacia oleracea</i> L.	<i>FUL</i>	EU726486
<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>BEL1</i>	AB546646
<i>Trochodendron aralioides</i> P.F.Siebold & Zucc.	<i>FUL</i> -like	EF436258
<i>Vitis vinifera</i> L.	<i>API</i> -like	AY538746
	<i>FUL</i> -like	AY538747
	<i>MADS1</i>	AF265562
	<i>MADS5</i>	AF373604
	<i>PI</i> -like	DQ059750
	<sup>2</sup>	CU459223
	<sup>2</sup>	CU459240
<i>Zea mays</i> L.	<sup>2</sup>	XM_002272650
	<i>SILKY1</i>	AF181479
	<i>ZAG2</i>	NM_001111908
	<i>ZAPI</i>	NM_001111863
	<i>ZMM2</i>	NM_001111456
	<i>ZMM3</i>	AF112150
	<i>ZMM6</i>	NM_001111683
	<i>ZMM16</i>	NM_001111666
	<i>ZMM29</i>	NM_001111667

<sup>1</sup> Sequenzen im Rahmen dieser Arbeit ermittelt. Die übrigen Sequenzen stammen aus GenBank.

<sup>2</sup> nicht zugeordnet

## 2.7 Raum-zeitliche Genexpressionsanalysen – *in situ* Hybridisierung

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand raum-zeitlicher Expressionsmuster oben beschriebener Kandidatengene zweier nah verwandter *Lepidium*-Arten mit unterschiedlicher Frucht-Morphologie Rückschlüsse auf die genetische Basis der Regulation von Öffnungs- bzw. Schließfrüchten zu erhalten. Die Durchführung der *in situ* Hybridisierungsversuche erfolgte im allgemeinen nach Zachgo (2002).

### 2.7.1 Etablierung der *in situ* Hybridisierung in *Lepidium*

Die Methode der *in situ* Hybridisierung in der Gattung *Lepidium* wurde zunächst mit „Anti-Sense“-Sonden für das Histon *H4* etabliert, bevor Hybridisierungen mit den Kandidatengenegen durchgeführt wurden. Die *H4*-Gene von *L. campestre*, *L. appelianum* sowie *Ae. carneum* wurden mit Primern isoliert, die von der *H4*-Sequenz von *Arabidopsis* (AT2G28740) abgeleitet wurden. Bei dieser Etablierungsmaßnahme wurde die ideale Fixierung der Gewebe sowie diejenige Menge an Sonde bestimmt, die zu ausreichend starken Hybridisierungssignalen in den histologischen Schnitten führte. Die Menge der eingesetzten Sonde konnte hierbei leicht variieren.

## 2.7.2 Einbetten von Pflanzengeweben

### 2.7.2.1 Fixierung in FAE / Paraformaldehyd

Die Fixierung der Blüten und Früchte erfolgte in zwei verschiedenen Medien (Paraformaldehyd-Fixativ oder FAE-Fixativ). Blüten und Früchte der ausgewählten Ontogenie-Stadien wurden in vorgekühltem Fixativ für 20 min bei ~300mbar entgast, um Lufteinschlüsse im Gewebe zu entfernen und eine gleichmäßige Fixierung der Pflanzengewebe zu gewährleisten. Die Fixierung erfolgte unter leichtem Schütteln (16h, 4°C). Nach zweifachem Waschen der Gewebe mit 0,1M Phosphatpuffer und anschließender Dehydrierung (30% EtOH (v/v), 50% EtOH (v/v), je 30 min) konnten die Proben in 70% EtOH (v/v) bei 4°C gelagert werden.

### 2.7.2.2 Einbetten in Paraffin

*In situ* Hybridisierungen wurden auf Dünnschnitten (6-14µm) durchgeführt. Um Dünnschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms zu erzeugen, mussten die Gewebe zunächst in DMSO-haltiges Paraffin (McCormick, USA) eingebettet werden.

#### Paraffin-Einbettung:

85 %	EtOH (v/v) (mit DEPC)	60 min
95 %	EtOH (v/v) (mit DEPC)	60 min
100 %	EtOH (mit DEPC)	60 min
2:1	EtOH : Histo-clear	30 min
1:1	EtOH : Histo-clear	30 min
1:2	EtOH : Histo-clear	30 min
100 %	Histo-clear	30 min
100 %	Histo-clear	4 h
1:1	Histo-clear : Paraffin (flüssig)	ÜN

Ab dem Folgetag wurde das Histo-clear in den Proben sukzessive durch flüssiges Paraffin ausgewaschen. Nach drei bis fünf Tagen wurden die Gewebeproben durch abkühlen des Paraffins fixiert. Die Proben waren so für mehrere Monate haltbar.

### 2.7.2.3 Erstellen von Gewebeschnitten am Mikrotom

Einzelne Gewebe wurden aus dem Paraffinblock herausgetrennt und auf geeigneten Probenträgern mit Paraffin befestigt. Die so vorbereiteten Präparate konnten am Mikrotom bearbeitet werden. Die Dünnschnitte besaßen im Allgemeinen eine Dicke von 7µm. Die Schnitte wurden aus dem Streckbad (42°C) auf Objektträger überführt (Superfrost Ultra Plus<sup>®</sup>, Menzel, Braunschweig) und waren nach Trocknung (42°C, ÜN) zur *in situ* Hybridisierung bereit.

### 2.7.3 *in situ* Sondentemplate

Sondentemplates für RNA-Sonden wurden aus Plasmiden mit Volllängenklonen hergestellt (vgl. 2.5.8), da längere Sonden erfahrungsgemäß zu besseren Ergebnissen führen.

Für jedes Gen wurden spezifische Primer entwickelt. Die fwd- und rev-Primer besaßen zudem – je nach sense- oder antisense-Richtung – eine T7 RNA-Polymerase-Bindestelle bzw. eine Erkennungssequenz für eine Endonuklease. Diese Primer wurden zur Amplifikation von Sondentemplates verwendet (vgl. 2.5.3). Die PCR-Produkte wurden nach Auftrennung im Agarosegel aufgereinigt, anschließend erfolgte eine Restriktion. Idealerweise wurden Endonukleasen ausgewählt, die einen 5'-Überhang produzierten, um das Abfallen der T7-RNA Polymerase bei der *in vitro* Transkription (vgl. 2.7.4) zu vereinfachen (XbaI, NcoI).

Bei einer zweiten angewandten Methode der Template-Erstellung wurden Volllängenkclone mittels Endonukleasen aufgeschnitten. In diesen Fällen wurden auf dem Plasmid (pGEM-T) befindliche RNA-Polymerase-Bindestellen (SP6 und T7 RNA-Polymerase) als Initiator für die *in vitro* Transkription verwendet (vgl. 7.4).

### 2.7.4 *in vitro* Transkription

Die Herstellung DIG-markierter Sonden für die *in situ* Hybridisierung erfolgte mittels DNA-abhängiger RNA-Polymerasen (SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase) nach dem folgenden Protokoll:

#### *in vitro* Transkription:

	DEPC		} zusammen 13,5 µl
	200ng DNA-Template	(bei aufgeschnittenem Plasmid entsprechend mehr)	
	2,0 µl	10 x Transkriptions-Puffer	
	2,0 µl	DIG RNA Labeling Mix (Roche, Mannheim)	
	2,0 µl	RNA-Polymerase (T7 / SP6)	
	0,5 µl	RNase Inhibitor	
	<u>20,0 µl</u>	<u>Gesamtansatz</u>	
Inkubation:	2 h, 37°C	→	1µl Entnahme für Agarosegel
	Zugabe von		
	2µl		DNase I
	2µl		tRNA
Inkubation:	15 min, 7°C	→	1µl Entnahme für Agarosegel
Stoppen der Reaktion & Fällung			
	2µl		EDTA
	½ Volumen		7,8 M Ammonium-Acetat
	2 Volumen		100% EtOH

Die Fällung erfolgte über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nach Zentrifugation, ( $12.000 \times g$ , 30 min), zweimaligem Waschen (80% EtOH (v/v), mit DEPC angesetzt) sowie Resuspendieren der Sonden in DEPC waren diese einsatzbereit.

### 2.7.5 Hydrolyse von RNA-Sonden

Sonden mit einer Länge  $> 400\text{bp}$  wurden hydrolysiert, kürzere Sonden konnten direkt für Hybridisierungsversuche verwendet werden, wie z.B. *Histon 4*-Sonden mit einer Länge von etwa  $\sim 300\text{bp}$ . *RPL*- oder *FUL*-Sonden hingegen wurden hydrolysiert. Zu hydrolysierende Sonden wurden mit DEPC auf  $100\mu\text{l}$  erweitert und mit  $100\mu\text{l}$  2 x Hydrolyse-Puffer versetzt. Die Hydrolyse erfolgte bei  $60^{\circ}\text{C}$ , die Dauer war abhängig von der Länge der Sonde. Die Hydrolyse-reaktion wurde auf Eis mit  $1\mu\text{l}$  Essigsäure abgestoppt, die Fällung der Sonden erfolgte durch die Zugabe von  $7\mu\text{l}$  3M NaAc,  $1\mu\text{l}$  tRNA,  $1\mu\text{l}$  Poly(A) sowie  $210\mu\text{l}$  Isopropanol (2h,  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Nach Präzipitation (30 min,  $12.000 \times g$ ) wurden die Sonden zweimal mit 80% EtOH (v/v) gewaschen.

Berechnung der Hydrolyse-Dauer: 
$$\text{Dauer [min]} = \frac{(L_0 - L_F)}{K \cdot L_0 \cdot L_F}$$

$K$  = konstante Rate (0,11);  $L_0$  = Länge der RNA-Sonde vor Hydrolyse [kb];  $L_F$  = Ziellänge der RNA-Sonde [kb]

### 2.7.6 Qualitätsabschätzung von RNA-Sonden

Die Qualitätsabschätzung der RNA-Sonden erfolgte mittels Dot Blot. Dafür wurde je  $1\mu\text{l}$  einer 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 Sondenverdünnung auf eine Nylonmembran aufgetragen und eine DIG-Antikörper-Reaktion durchgeführt. Als Kontrolle diente DIG-markierte Kontroll-RNA (Roche, Mannheim), die in den gleichen Verdünnungen auf die Membran aufgebracht wurde. Je nach Stärke der „Dots“ in der stärksten Verdünnung wurde bestimmt, wie viel Sonde pro Objektträger zum Einsatz kam. Überdies wurde während der *in vitro* Transkription je  $1\mu\text{l}$  Sonde vor bzw. nach dem DNA-Verdau entnommen. Diese während der *in vitro* Transkription entnommenen Proben wurden zur Qualitätsabschätzung elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt.

## 2.7.7 *in situ* Hybridisierung

### 2.7.7.1 Vorbehandlung histologischer Schnitte

Die Dünnschnitte auf den Objektträgern mussten vor der *in situ* Hybridisierung vorbehandelt werden. Unter anderem musste das Paraffin entfernt werden. Hierzu wurden mehrere Waschschriffe durchgeführt:

3 x	5 min	100% HistoClear	
	5 min	HistoClear : EtOH p.A. (1:1)	
2 x	5 min	100% EtOH p.A.	
	5 min	95% EtOH p.A. (v/v), in 0,85% NaCl	
	5 min	85% EtOH p.A. (v/v), in 0,85% NaCl	
	5 min	70% EtOH p.A. (v/v), in 0,85% NaCl	
	5 min	50% EtOH p.A. (v/v), in 0,85% NaCl	
	5 min	30% EtOH p.A. (v/v), in 0,85% NaCl	
	2 min	0,85% NaCl	
	2 x	10 sek	DEPC
		20 min	2 x SSPE, 70°C
		20 min	Proteinase K-Verdau (1µg/ml)
5 min		2 x SSPE, RT	
5 min		0,85% NaCl	
5 min		70% EtOH p.A. (v/v), in 0,85% NaCl	
5 min		90% EtOH p.A. (v/v), in 0,85% NaCl	
5 min		100% EtOH p.A.	

Nach dieser Probenvorbereitung wurden die Objektträger an der Luft getrocknet und wie unter 2.7.6.2 erläutert mit den jeweiligen Sonden beladen.

### 2.7.7.2 Hybridisierung

Die entsprechende Menge Sonde je Objektträger wurde mit DEPC auf 22µl erweitert, für 2 min bei 85°C denaturiert und auf Eis gestellt. Für jeden Objektträger wurden 128µl Hybridisierungsmix sodann mit der gewünschten RNA-Sonde gemischt und auf dem Objektträger ausgestrichen. Der Hybridisierungsmix setzte sich wie folgt zusammen:

#### Hybridisierungsmix:

75 µl	Formamid
30 µl	Dextran-Sulfat
3,0 µl	50 x Denhardt-Mix
3,75 µl	tRNA
1,5 µl	Poly(A)
6,0 µl	50 x TE
9,0 µl	5 M NaCl

Die Hybridisierung erfolgte für 14 Stunden bei 50,5°C.

### 2.7.7.3 Immunologische Detektion

Vor der immunologischen Detektion wurden verschiedene Waschschriffe durchgeführt, um beispielsweise fehlerhaft gebundene Sonden zu entfernen und die immunologische Detektion vorzubereiten.

Nachfolgend sind die Waschschritte vor der immunologischen Detektion angegeben:

5 min	3 x SSPE, RT
5 min	3 x SSPE, RT
30 min	3 x SSPE, 50°C
30 min	3 x SSPE, 50°C
5 min	1 x NTE, RT
5 min	1 x NTE, RT
30 min	1 x NTE, 37°C + RNase A, 40µg/ml
5 min	1 x NTE, RT
30 min	1,5 x SSPE, 52°C
30 min	1,5 x SSPE, 52°C
30 min	0,3 x SSPE, 52°C
5 min	Puffer 1
30 min	Puffer 1 + 0,5% Blocking Reagent
30 min	Puffer 1 + 1% BSA + 0,1% Tween 20
60 min	Puffer 1 + 1% BSA + 1:3000 AntiDIG AP FAB-Fragment
10 min	Puffer 1 + 0,1% Tween 20
15 min	Puffer 1 + 0,1% Tween 20
20 min	Puffer 1 + 0,1% Tween 20
20 min	Puffer 1 + 0,1% Tween 20
5 min	Puffer 2 + 0,1% Tween 20
5 min	Puffer 2 + 0,1% Tween 20

Schließlich wurden die Objektträger in Färbetröge überführt und dort über Nacht in einer Detektionslösung (vgl. 7.2) inkubiert.

#### 2.7.7.4 Mikroskopische Auswertung

Nach Waschen (2 x je 5 min mit H<sub>2</sub>O), Trocknen (je 30 sek in 50%, 70%, 95%, 100% EtOH, v/v) und Versiegeln der hybridisierten Proben auf dem Objektträger mit Histokitt (Roth, Karlsruhe) wurden die Hybridisierungsergebnisse unter dem Lichtmikroskop (DM5000B, Leica, Wetzlar) betrachtet und die verschiedenen Fruchtentwicklungsstadien digital fotografiert.

## 2.8 Southern Blot

Zur Charakterisierung der Kandidatengene wurde deren Kopienzahl mittels Southern Blot (SOUTHERN 1975) ermittelt. Gesamt-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen (ApaI, EcoRV, FseI, NotI, SacI, XbaI) verdaut und im Agarosegel (0,8%, 30V) aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der DIG-markierte „DNA Molecular Weight Marker VII“ (Roche, Mannheim) verwendet.

Nach Färbung und Überprüfung der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente denaturiert (0,2 M HCl; bis Farbumschlag), anschließend neutralisiert (0,2 M NaOH, 30 min) und in 10 x SSC äquilibriert (2 x 15 min). Der Kapillartransfer der DNA auf eine Nylonmembran (ZetaProbe, BioRad, München) erfolgte mit 10 x SSC über Nacht. Nach Waschen der Membran (2 x SSC) erfolgte die Fixierung der DNA per Cross-linking (2 min, UV-Licht). Auf diese Weise vorbereitete Membranen wurden für DNA-DNA-Hybridisierungen eingesetzt.

## 2.8.1 Southern Hybridisierung

Für die Hybridisierung war es erforderlich, dass DNA-Sonden an Ziel-DNA auf der Nylon-Membran binden. Die DNA-Sonden wurden mit dem DIG-DNA-Labeling Mix (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben hergestellt. Als Templates wurden Klone mit geeigneten 3'- bzw. 5'-Enden der Kandidatengene verwendet, wobei diese Templates nach Möglichkeit keine Intron-Exon-Übergänge enthalten sollten. Restringierte gDNA auf der Membran kann Introns enthalten, die Sonden-templates aufgrund des Ursprungs aus cDNA hingegen nicht. Die für die Sondenherstellung verwendeten Primer sind im Anhang (vgl. 7.1) angegeben.

Die Membranen (vgl. 2.8) wurden prähybridisiert (Hybridisierungspuffer, 65°C, 1 h) und anschließend mit verschiedenen Sonden bei 65°C über Nacht hybridisiert. (Hybridisierungspuffer + Sonde, 10 min bei 95°C denaturiert). Zum Entfernen fehlerhaft gebundener Sonden und um die immunologische Detektion vorzubereiten folgten mehrere Stringenzwaschungen.

### Waschschritte:

Puffer 1	5 min
Waschpuffer 1	2 x 15 min
Waschpuffer 2	2 x 15 min
Puffer 1 + AntiDIG AP FAB-Fragment	30 min
Puffer 1	10 min
Puffer 2 (pH 9.5)	30 min

Die immunologische Detektion erfolgte in Puffer 2 (pH 9.5) mit 1,5µl BCIP und NBT je ml Puffer. Bereits nach kurzer Zeit waren Bandenmuster erkennbar, diese wurden mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Membranen konnten für eine erneute Hybridisierung mit einer anderen Sonde wiederverwendet werden. Hierzu wurden sie mit 1:10 DMF/Ethanol entfärbt und mit kochendem dH<sub>2</sub>O gestrippt.

## 2.9 Northern Blot

### 2.9.1 „Housekeeping Genes“

Zur Positivkontrolle bei Northern Blots wurde auf die Verwendung von „Housekeeping Genes“ zurückgegriffen, welche eine in unterschiedlichen Gewebeteilen (z.B. Wurzel, Spross oder Blüten) ähnlich starke Expression zeigen und somit als Ladekontrolle dienen können. Allerdings kann die Expression in einzelnen Gewebeteilen variieren, weshalb häufig die Verwendung mehrerer sogenannter „Housekeeping Genes“ präferiert wird (PELEMAN *et al.* 1989; CZECHOWSKI *et al.*

2005; NICOT *et al.* 2005). Da die Expression des *18S*-Gens sehr gleichmäßige Ergebnisse lieferte, wurde schließlich allein dieses Gen als Kontrolle für die Northern Analysen verwendet.

### 2.9.2 Denaturierendes Agarosegel

Für die Auftrennung von RNA für Northern Analysen wurden 3%-ige (w/v) denaturierende Agarosegele (LE-Agarose, Lonza, Köln) verwendet (3g LE Agarose, 50,25ml Formaldehyd, 30ml 10 x MEN-Puffer). Je 20µg Proben-RNA wurden mit 5µl Formaldehyd, 10µl Formamid, 5µl 10 x MEN-Puffer, 5µl RNA-Gel-Ladepuffer denaturiert (15 min, 65°C) und direkt aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80V. Zu Dokumentationszwecken wurde ein Foto des mit Ethidiumbromid gefärbten Gels erstellt.

### 2.9.3 RNA-Transfer

Der Transfer der aufgetrennten RNA erfolgte mithilfe eines Vakuum-Blotting-Systems bei 50mbar (Pharmacia, Uppsala, Schweden) auf eine Nylonmembran (Zeta-Probe, Bio-Rad, München). Als Transferpuffer diente ein Hochsalzpuffer (10 x SSC). Der Transfer wurde nach 3h beendet, die Membran in 2 x SSC gewaschen und die RNA per UV-Cross-Linking an der Membran fixiert (2 min, UV-Tisch, 312nm).

### 2.9.4 Sonden

Nachdem Vorversuche mit dem Digoxigenin-System keine Ergebnisse erbrachten, wurde ein System mit radioaktiv markierten Sonden angewendet, die Northern Hybridisierung erfolgte demnach mit radioaktiv markierten Sonden. Die verwendeten Primer für die Erstellung der Templates sind im Anhang (vgl. 7.1) angegeben. Diese wurden mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (Hartmann Analytik, Braunschweig) nach dem folgenden Protokoll hergestellt:

#### Herstellung radioaktiv markierter Sonden:

100 ng Template-DNA (Zielgen)	}	gesamt: 33 µl
ddH <sub>2</sub> O		
	→	Denaturierung (5 min in 100°C H <sub>2</sub> O)
	→	kühlen auf Eis (5 min)
Zugabe von		
5µl		Oktadeoxyribonukleotide in 10 x Labeling Puffer
6µl		dNTP-Mix (je 2µl dATP, dTTP, dGTP)
5µl		$\alpha$ - <sup>32</sup> P dCTP, 3000 Ci/mmol, 50µCi
1µl		Klenow-Fragment

Die Inkubation (1 h, 37°C) wurde durch Zugabe von 5µl 0,2M EDTA gestoppt. Die Sonden wurden via illustra MicroSpin G-50 Columns (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben aufgereinigt, denaturiert (10 min, 95°C) und direkt auf die Membranen appliziert.

### **2.9.5 Northern Hybridisierung und Phosphor-Imaging**

Die Membranen (vgl. 2.8) wurden zunächst prähybridisiert (20 min, 65°C; 0,5M Natriumphosphatpuffer, pH7.2, 7% SDS). Die denaturierten Sonden (10min, 95°C) wurden vorsichtig in die Hybridisierungsröhren gegeben, hier erfolgte die Hybridisierung über Nacht im gleichen Puffer (16 h, 65°C). Nach der Hybridisierung erfolgten verschiedene Waschschrte (2 x mit 1% SDS (w/v), 0,1 x SSC, 68°C; 2 x mit 0,1% SDS (w/v), 0,1 x SSC, 68°C).

Anschließend wurden die Membranen in einen Kunststoffbeutel überführt und zur Radiographie auf einen Phosphor-Screen aufgebracht. Je nach Strahlungsleistung der Sonden wurde der Screen nach 1-5 Tagen Belichtung am Phosphorimager (Molecular Dynamics, Essen) ausgelesen.

Die Membranen konnten nach dem Entfernen der radioaktiven Sonden (Strippen; 10 min, 95°C; 0,5 % SDS (w/v), 0,1 % SSC) erneut - für Hybridisierungen mit anderen Sonden - eingesetzt werden.

### **2.10 Pollenschlauchwachstum**

Versuche zum Pollenschlauchwachstum sollten Hinweise darauf geben, ob Pollen von *L. campestre* auf Narben von *L. appelianum* bzw. Pollen von *L. appelianum* auf Narben von *L. campestre* auskeimen können. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob Pollen der zwei *Lepidium*-Arten grundsätzlich in der Lage sind, in Narben der fremden Art auszukeimen und damit potentiell fähig sind, fremde Blüten zu befruchten.

#### **2.10.1 Blütenfixierung**

Frisch geerntete Blüten wurden in mit Carnoyscher Lösung (drei Teile 70% EtOH (v/v), ein Teil 96% Essigsäure) gefüllten Schnappdeckelgläschen über Nacht fixiert. Nach Entfernung der Carnoyschen Lösung und Waschen mit 70% EtOH (v/v) konnten die Blüten in 70% EtOH (v/v) über mehrere Monate gelagert werden.

### **2.10.2 Färben der Pollenschläuche**

Zum Schutz vor physikalischer Beschädigung von Narben- und Griffelgewebe wurden je zwei Blüten in ein Eppendorf-Cup gegeben und mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Durch Zugabe von 1M NaOH (30 min) erfolgte die Mazeration des Gewebes. Nach erneutem Waschen mit dH<sub>2</sub>O wurden die Pollenschläuche gefärbt (Anilinblau-Lösung, über Nacht). Anschließend wurden die Blüten ein drittes Mal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Präparation wurden die Blüten auf Objektträger überführt, die Fruchtknoten vorsichtig freigelegt, mit einem Tropfen Glycerin beträufelt und mit einem Deckgläschen überdeckt.

Die mit Anilinblau gefärbten Pollenschläuche konnten im Fluoreszenzmikroskop (365nm) betrachtet werden.

### **2.11 Kreuzungsexperimente**

Um zu überprüfen, ob die beiden Schwesterarten *Lepidium appelianum* und *Lepidium campestre* miteinander Nachkommen hervorbringen können, wurden Kreuzungsversuche unternommen. Hierzu wurden an gerade geöffneten Blüten (Entwicklungsstadium 13; vgl. FERRANDIZ (1999) und SMYTH (1990)) die Antheren entfernt die Narben mit Pollen der jeweils anderen Art bestäubt. Eine unerwünschte, spätere Bestäubung wurde verhindert, indem kleine Tütchen über die bestäubten Blüten gestülpt wurden. Nach der Reife wurden die markierten Früchte auf Samenbildung kontrolliert. Ausgebildetes Saatgut wurde sorgfältig aufbewahrt und später zu Kontrollzwecken und zum Nachweis potentieller Hybridisierung auf Brassicaceen-Erde ausgesät. Als Negativkontrolle wurden bei weiteren Blüten die Antheren entfernt, diese Blüten wurden daraufhin jedoch nicht bestäubt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Isolation von Fruchtentwicklungsgenen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolation der Fruchtentwicklungsgene auf die MADS-Box Gene *FUL*, *SHP1* und *SHP2* sowie das BELL-Homöodomänen-Gen *RPL* beschränkt. Die bHLH-Gene *ALC* und *IND* wurden im Schwesterprojekt der AG Theißen an der Universität Jena isoliert. Um in den Laboratorien der Universität Osnabrück mit *in situ*-, Southern- und Northern-Hybridisierungen beginnen zu können, wurden Sequenzdaten der Gene *ALC* und *IND* von Teresa Lenser zur Verfügung gestellt.

##### 3.1.1 3'-RACE – Isolation von Fruchtentwicklungsgenen

Mittels 3'-RACE-Versuchen ist es möglich, die 3'-Enden unbekannter Gene zu isolieren, mit denen downstream-Versuche unternommen werden sollten. Die aus den 3'-RACE-Analysen erhaltenen Sequenzen wiesen Längen zwischen 700bp und 1000bp auf (**Abb. 3.1**). BLAST-Suchen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) der Sequenzierungsergebnisse ergaben hohe Ähnlichkeiten der sequenzierten Gene zu den Fruchtentwicklungsgenen aus *Arabidopsis thaliana* (**vgl. 1.4**) sowie möglicher Orthologer weiterer Brassicaceen, wie z.B. *Brassica napus*, *B. rapa* oder *Capsella bursa-pastoris*, soweit diese in der GenBank verfügbar waren. Die Anzahl der Treffer für die besser untersuchten MADS-Box Gene (*FUL*, *SHP1*, *SHP2*) war deutlich höher als die für das BELL-Homöodomänen Gen *REPLUMLESS*.

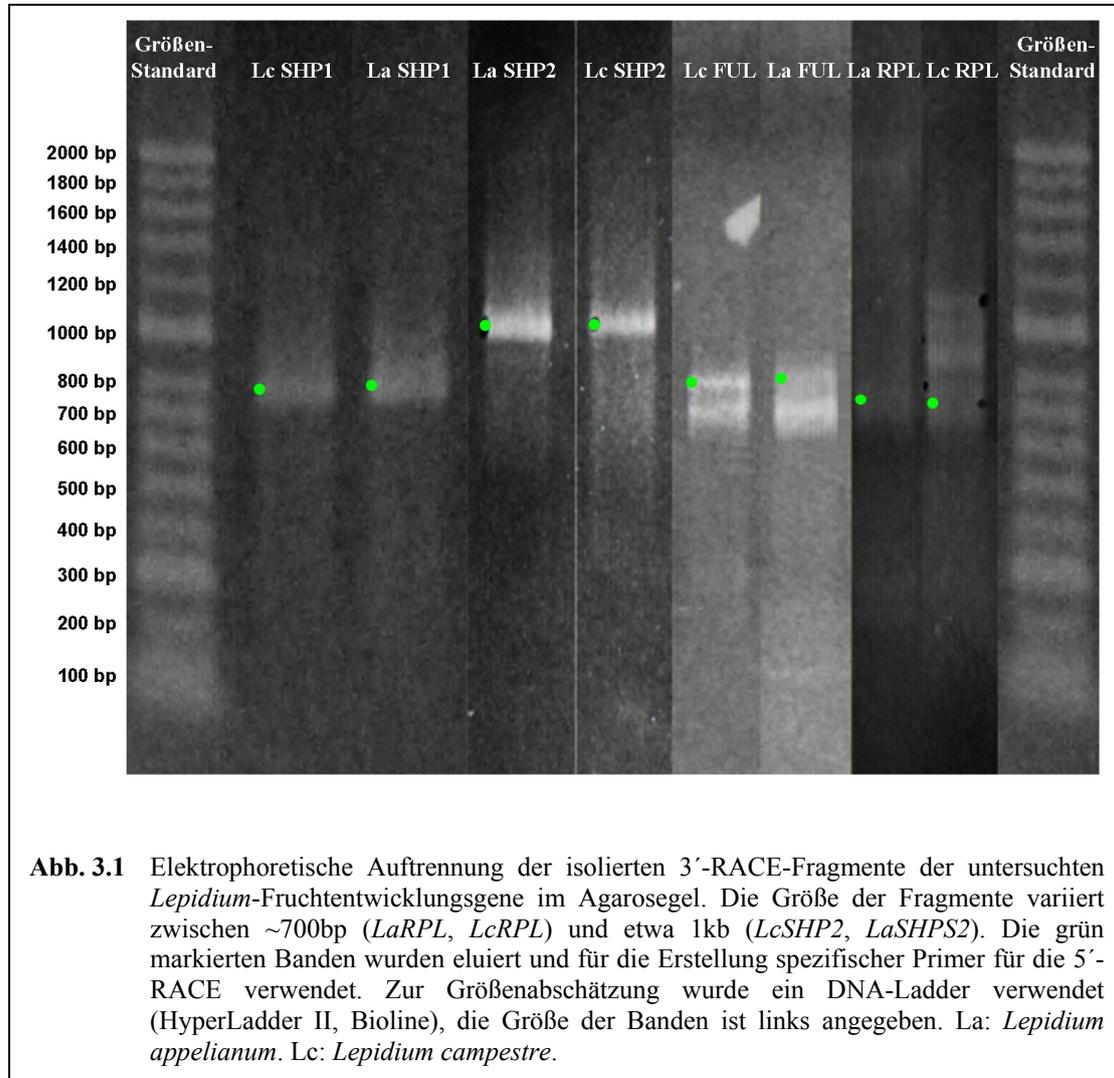
##### 3.1.2 5'-RACE – Isolation von Fruchtentwicklungsgenen

Ergaben sich für die klonierten 3'-Sequenzen bei der BLAST-Suche positive Treffer, so wurden nachfolgend die 5'-Enden kloniert und sequenziert. Im Falle der *REPLUMLESS*-Gene, bei denen mit dem ersten 5'-RACE-Durchlauf nicht die komplette mRNA kloniert werden konnte, wurde dieser Schritt ein zweites Mal durchgeführt. Durch erfolgreiche 5'-RACE-Versuche konnte für jedes Gen die komplette cDNA isoliert werden und schließlich am 5'- bzw. 3'-Ende Primer für Vollängenklone entwickelt werden.

##### 3.1.3 Herstellung von Vollängenklonen

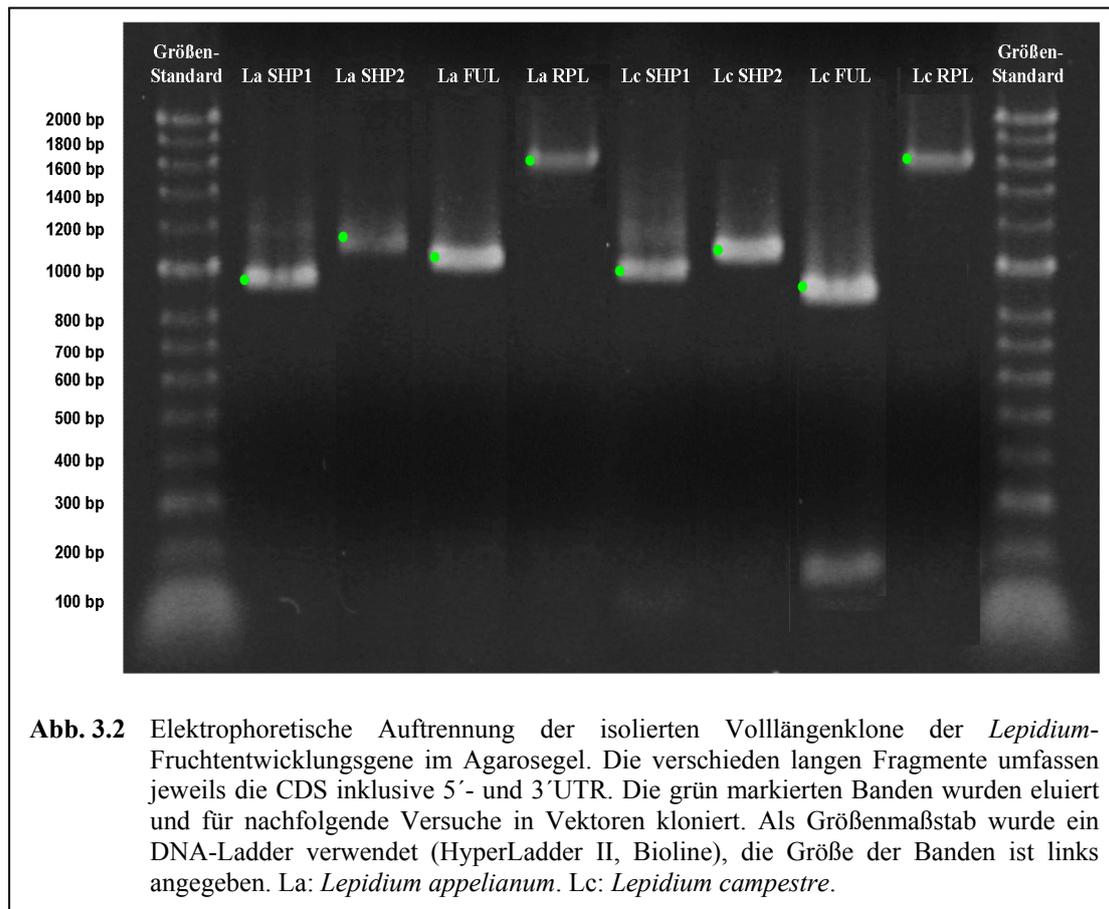
Nach dem Klonieren der vollständigen mRNAs wurden Vollängenklone erstellt. Diese beinhalteten die komplette mRNA, inklusive der nicht translatierten Bereiche

(5'-UTR sowie 3'-UTR). Trotz der erfolgreichen Klonierung der 5'UTR-Bereiche der *RPL*-Gene beginnen die Vollängenklone dieser Gene mit der initialen Startsequenz, welche auf der *Arabidopsis*-Sequenz beruht. Die Fragmentlängen aller Vollängenklone sind in **Abb. 3.2** dargestellt.



Insgesamt wurden so in den untersuchten *Lepidium*-Arten je vier potentielle Kandidatengene isoliert; jeweils drei MADS-Box Gene (*SHP1*, *SHP2* und *FUL*) sowie das BELL-Homöodomänen-Gen *RPL*. Die Länge der kodierenden Bereiche (CHANDLER *et al.* 2005) aller isolierten möglichen Fruchtentwicklungsgene stimmte recht genau mit den bekannten kodierenden Sequenzen (CDS) aus *Arabidopsis thaliana* überein (vgl. **Tabelle 3.1**).

Zusätzlich zu den in *Lepidium* isolierten Genen war es möglich, ein einzelnes *SHATTERPROOF*-Gen (*SHP2*-like) aus *Aethionema carneum* zu isolieren. Die Länge dieses Gens war mit 714 bp etwas kürzer als das Gen aus *Arabidopsis* und *Lepidium* (747 bp bzw. 741 bp). Dieses Gen wird in Kapitel **4.3** näher betrachtet.



**Tabelle 3.1** Länge der kodierenden Sequenzen (CDS) sowie Länge der isolierten mRNA der mutmaßlichen *Lepidium*- und *Aethionema*-Orthologen im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* Fruchtentwicklungsgenen.

	<i>FUL</i>	<i>SHP1</i>	<i>SHP2</i>	<i>RPL</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i> , CDS	729 bp	741 bp	747 bp	1728 bp
<i>L. campestre</i> , CDS	729 bp	759 bp	741 bp	1701 bp
<i>L. appelianum</i> , CDS	732 bp	759 bp	747 bp	1722 bp
<i>Ae. carneum</i> , CDS partiell	-	-	714 bp	-
<i>Arabidopsis thaliana</i> , mRNA	1113 bp	1209 bp	1135 bp	2017 bp
<i>L. campestre</i> , mRNA	917 bp	980 bp	1052 bp	1850 bp
<i>L. appelianum</i> , mRNA	1014 bp	1003 bp	1102 bp	1896 bp
<i>Ae. carneum</i> , mRNA partiell	-	-	944 bp	-

### 3.2 Sequenzhomologien der untersuchten Fruchtentwicklungsgene

Nukleotidsequenzen der aus *Lepidium* und *Aethionema* isolierten mutmaßlichen orthologen Gene wurden zusammen mit Fruchtentwicklungsgenen aus *Arabidopsis*

*thaliana* aligniert und mit Hilfe des Programms PAUP\* die Sequenzhomologien errechnet (vgl. **Tabelle 3.2**). Relativ hohe Sequenzhomologiewerte auf Nukleotidebene (90,2 bis 98,1%) deuten bereits an, dass es sich bei den isolierten Genen aus *Lepidium* um die gesuchten Orthologen der *Arabidopsis thaliana* Fruchtentwicklungsgene handeln könnte. Insbesondere die MADS-Box Gene mit ihrer hoch konservierten MADS-Box weisen auf Aminosäureebene selbst zwischen den Gattungen *Arabidopsis* und *Lepidium* Werte von über 95% auf, die MADS-Box Gene der untersuchten *Lepidium*-Arten haben sogar eine Ähnlichkeit von über 97%. Ähnlich gestalten sich die Sequenzähnlichkeiten bei *REPLUMLESS*. Hier liegen die Nukleotidsequenzähnlichkeiten bei 91,1 bis 91,3% (*Arabidopsis* versus *Lepidium*), die Aminosäure-Ähnlichkeit liegt über 94%. Der Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen zwischen den *Lepidium*-Arten zeigt etwas niedrigere Werte als bei den MADS-Box Genen, ist mit 97,5 bzw. 97,4 % aber immer noch sehr hoch (vgl. **Tabelle 3.2**).

**Tabelle 3.2** Sequenzähnlichkeiten putativ orthologer Gene von *L. campestre*, *L. appelianum*, *Ae. carneum* und *A. thaliana*. Die oberen Werte geben die Nukleotid-Ähnlichkeit in Prozent (links) und die gesamte Anzahl an Aminosäureänderungen an. Die unteren Werte geben die Aminosäure-Ähnlichkeiten (linker Wert) sowie die Aminosäure-Identität (rechter Wert) in Prozent an. „--“: Sequenzdaten nicht vorhanden.

Genname	<i>A. thaliana</i> - <i>L. campestre</i>	<i>A. thaliana</i> - <i>L. appelianum</i>	<i>L. appelianum</i> - <i>L. campestre</i>	<i>A. thaliana</i> - <i>Ae. carneum</i>
<i>SHATTERPROOF1</i>	90,3 / 11 97,6 / 94,0	90,2 / 12 97,6 / 93,7	98,1 / 2 100 / 99,2	--
<i>SHATTERPROOF2</i>	91,8 / 12 98,4 / 95,1	91,5 / 13 97,2 / 94,0	97,5 / 5 98,8 / 97,2	79,7 / 30 91,1 / 83,8
<i>FRUITFULL</i>	91,9 / 34 97,1 / 94,7	92,5 / 30 97,5 / 95,5	97,8 / 12 98,8 / 97,5	--
<i>REPLUMLESS</i>	91,1 / 34 94,6 / 90,8	91,3 / 30 95,5 / 91,6	97,5 / 12 97,4 / 96,7	--

Bei näherer Betrachtung der Nukleotid-Substitutionen in den *Lepidium*-Genen im Vergleich zu *Arabidopsis* wird deutlich, dass diese gleichmäßig über die gesamten Gene verteilt sind (**Abb. 3.3**). Hiervon ausgenommen ist lediglich eine Region im *REPLUMLESS*-Gen, die einen Bereich mit deutlich geringerer Substitutionsrate aufweist (bp 510-654). Bei diesem Bereich handelt es sich um die hoch konservierte

MEINOX-Region (**Abb. 3.3 d**, unterstrichen) (SMITH & HAKE 2003). Diese Region wird für Protein-Protein-Interaktion zwischen PBC- und MEINOX-Genen benötigt; hierbei handelt es sich um Unterfamilien der BELL-Homöodomänen-Gene (BELLAOUI *et al.* 2001). Die ebenfalls hoch konservierte Homöodomäne (**Abb. 3.3 d**, fett gedruckt) wiederum weist gleichmäßig verteilte Nukleotid-Substitutionen auf. Auffällig ist, dass innerhalb dieser hoch konservierten Genabschnitte nur wenige „nicht-synonyme“ Substitutionen zu finden sind.

Eine Vielzahl der Nukleotid-Substitutionen ist an der dritten Position eines Triplets zu finden (*Wobble*-Position). Diese wiederholt auftretenden „synonymen“ Substitutionen verursachen keinen Aminosäure-Austausch (stille Mutation) und verändern damit auch nicht die biologischen Eigenschaften eines Proteins.

### 3.3 Phylogenetische Analysen der Fruchtentwicklungsgene

Alle für die phylogenetischen Analysen verwendeten DNA-Sequenzdaten wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt, aligniert und anschließend in die originalen Nukleotid-Sequenzen zurückübersetzt. Auf diese Weise wird das Alignment optimiert, da Leserasterverschiebungen auf DNA-Ebene ausgeschlossen werden. Diese Alignments, für die ausschließlich die kodierenden Sequenzbereiche der untersuchten Gene herangezogen wurden, stellten die Basis für die Berechnung der phylogenetischen Stammbäume dar. Die DNA-Alignments sind in **Abb. 3.3 a - d** dargestellt.

Das beste Substitutionsmodell wurde für die jeweiligen Datensätze individuell bestimmt; als das beste Substitutionsmodell stellte sich bei allen Datensätzen das Modell „GTR+R+I“ heraus („General Time Reversible model with a proportion of invariable sites and a gamma shaped distribution of rates across sites“, KNOOP & MÜLLER (2006)).

Insgesamt konnten aus den zwei nah mit *Arabidopsis* verwandten *Lepidium*-Arten acht Fruchtentwicklungsgene isoliert werden, jeweils vier aus *L. appelianum* (Schließfrüchte) sowie vier aus *L. campestre* (Öffnungsfrüchte). Um zu klären, ob es sich um Orthologe zu *Arabidopsis*-Fruchtentwicklungsgenen handelt, wurden phylogenetische Analysen für die MADS-Box Gene und für die BELL Homöodomänen-Gene erstellt.

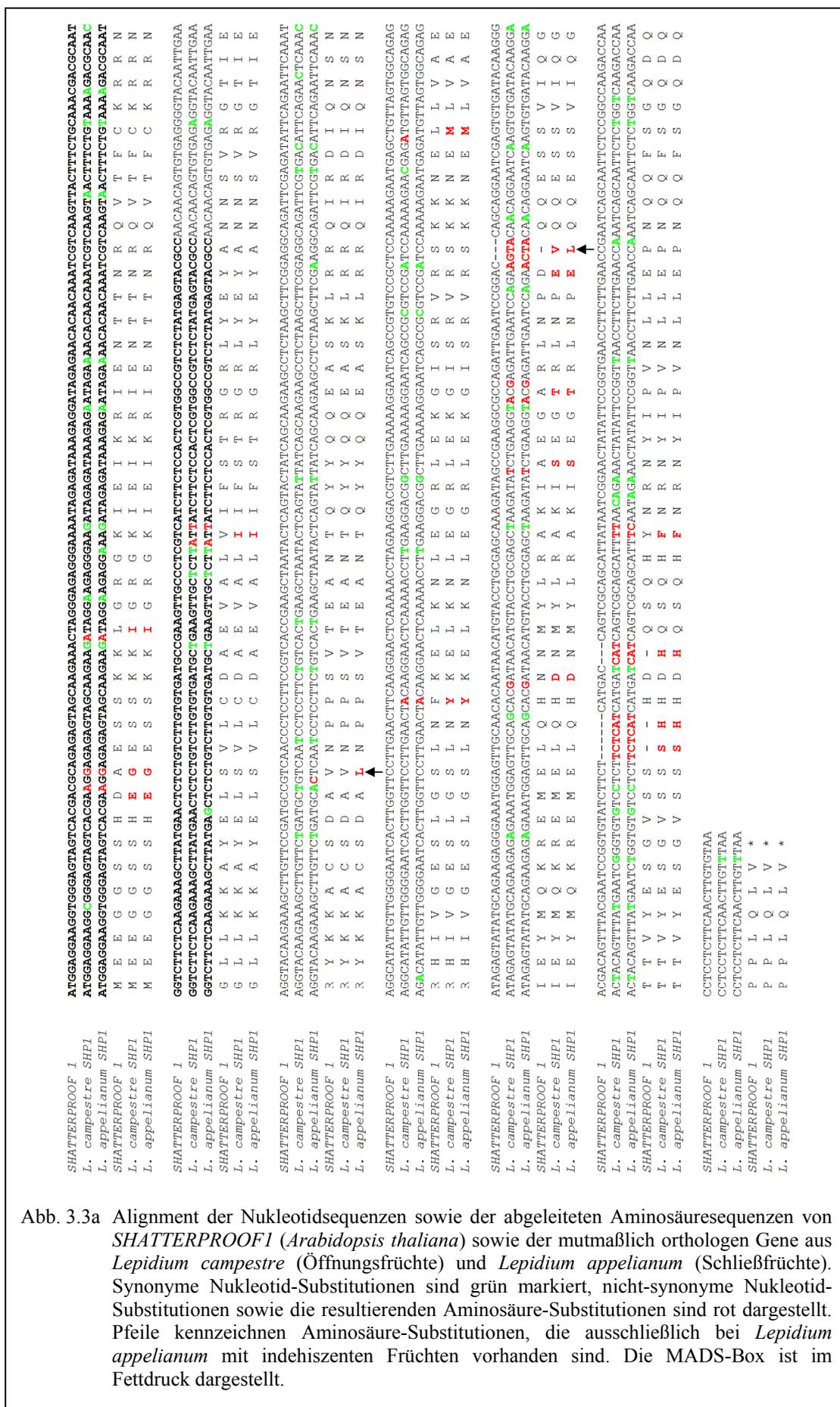


Abb. 3.3a Alignment der Nukleotidsequenzen sowie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *SHATTERPROOF1* (*Arabidopsis thaliana*) sowie der mutmaßlich orthologen Gene aus *Lepidium campestre* (Öffnungsfrüchte) und *Lepidium appelianum* (Schließfrüchte). Synonyme Nukleotid-Substitutionen sind grün markiert, nicht-synonyme Nukleotid-Substitutionen sowie die resultierenden Aminosäure-Substitutionen sind rot dargestellt. Pfeile kennzeichnen Aminosäure-Substitutionen, die ausschließlich bei *Lepidium appelianum* mit indehiszenten Früchten vorhanden sind. Die MADS-Box ist im Fettdruck dargestellt.



FRUITFULL	ATGGGAAGAGGTAGGGTTACGCTTGAAGAGGATAGAGCAAGAGTCAATAGCGCAAGTTACTTTTCAAGGAAGAGGTCCTGGTTTCTCTGCTGCGATGCTGAG
L. campestre FUL	ATGGGAAGAGGTAGGGTTACGCTTGAAGAGGATAGAGCAAGAGTCAATAGCGCAAGTTACTTTTCAAGGAAGAGGTCCTGGTTTCTCTGCTGCGATGCTGAG
L. appelianum FUL	ATGGGAAGAGGTAGGGTTACGCTTGAAGAGGATAGAGCAAGAGTCAATAGCGCAAGTTACTTTTCAAGGAAGAGGTCCTGGTTTCTCTGCTGCGATGCTGAG
FRUITFULL	M G R G R V Q L K R I E N K I N R Q V T F S K R R S G L L K K A H E I S V L C D A E
L. campestre FUL	M G R G R V Q L K R I E N K I N R Q V T F S K R R S G L L K K A H E I S V L C D A E
L. appelianum FUL	M G R G R V Q L K R I E N K I N R Q V T F S K R R S G L L K K A H E I S V L C D A E
FRUITFULL	GTTGCTCTCATCGTCTCTTCCAAAGGCAAACTCTTCGAAATATCCACCGCTTGTGATGGAGGATACCTTGAACGGCTATGATCGCTTATATATTCAGACAAACAACCTTGTGGCGGAGC
L. campestre FUL	GTTGCTCTCATCGTCTCTTCCAAAGGCAAACTCTTCGAAATATCCACCGCTTGTGATGGAGGATACCTTGAACGGCTATGATCGCTTATATATTCAGACAAACAACCTTGTGGCGGAGC
L. appelianum FUL	GTTGCTCTCATCGTCTCTTCCAAAGGCAAACTCTTCGAAATATCCACCGCTTGTGATGGAGGATACCTTGAACGGCTATGATCGCTTATATATTCAGACAAACAACCTTGTGGCGGAGC
FRUITFULL	V A L I V F S S K G K L F E Y S T D S C M E R I L E R Y D R Y L Y S D K Q L V G R D
L. campestre FUL	V A L I V F S S K G K L F E Y S T D S C M E R I L E R Y D R Y L Y S D K Q L V G R D
L. appelianum FUL	V A L I V F S S K G K L F E Y S T D S C M E R I L E R Y D R Y L Y S D K Q L V G R D
FRUITFULL	GTTTCACAAAGTGAATAATGGGTTTGAACAATGCTAAGCTCAAGGCAAGTGTGAGGTACTTGAAGAAACAAAAGAAATTTATGGGGAAGATCTTGATTCTGTTGAAGAGGCTCCAA
L. campestre FUL	GTTTCACAAAGTGAATAATGGGTTTGAACAATGCTAAGCTCAAGGCAAGTGTGAGGTACTTGAAGAAACAAAAGAAATTTATGGGGAAGATCTTGATTCTGTTGAAGAGGCTCCAA
L. appelianum FUL	GTTTCACAAAGTGAATAATGGGTTTGAACAATGCTAAGCTCAAGGCAAGTGTGAGGTACTTGAAGAAACAAAAGAAATTTATGGGGAAGATCTTGATTCTGTTGAAGAGGCTCCAA
FRUITFULL	V S Q S E N W I L E H A K L K A R V E V L E K N K R N F M G E D L D S L S L K E L Q
L. campestre FUL	V S Q S E N W I L E H A K L K A R V E V L E K N K R N F M G E D L D S L S L K E L Q
L. appelianum FUL	V S Q S E N W I L E H A K L K A R V E V L E K N K R N F M G E D L D S L S L K E L Q
FRUITFULL	AGCTTGGAGCATCAGCTCGATGCGATCAAGAGCATATGAGTCAAGAAAGCAAGTATGTTCCGAATCCATATCTCGCTCCAGAAAGAGATAAAGCCTTCCAGAGATCACAAACTTCGGTT
L. campestre FUL	AGCTTGGAGCATCAGCTCGATGCGATCAAGAGCATATGAGTCAAGAAAGCAAGTATGTTCCGAATCCATATCTCGCTCCAGAAAGAGATAAAGCCTTCCAGAGATCACAAACTTCGGTT
L. appelianum FUL	AGCTTGGAGCATCAGCTCGATGCGATCAAGAGCATATGAGTCAAGAAAGCAAGTATGTTCCGAATCCATATCTCGCTCCAGAAAGAGATAAAGCCTTCCAGAGATCACAAACTTCGGTT
FRUITFULL	S L E H Q L D A A I K S I R S R K N Q A M F E S I S A L Q K K D K A L Q D H N N S L
L. campestre FUL	S L E H Q L D A A I K S I R S R K N Q A M F E S I S A L Q K K D K A L Q D H N N S L
L. appelianum FUL	S L E H Q L D A A I K S I R S R K N Q A M F E S I S A L Q K K D K A L Q D H N N S L
FRUITFULL	CTCAAAAAGATTAAGGAGGGAGAAAAGGGTCCAGCAAGAGCAATAGTCCAAATGGTCCCAACTCTCTCT--TCAGTTCTTGGCTCCAAATCTGTCGTAACCTTCCAGAGATGGCTTTT
L. campestre FUL	CTTAAAAAGATTAAGGAGGGAGAAAAGGGTCCAGCAAGAGCAATAGTCCAAATGGTCCCAACTCTCTCTCTAATTCACCTTCTTCCCAACTCTCCCAACTCTCGCTTACCTTCCAGAGATGGCTTTT
L. appelianum FUL	CTTAAAAAGATTAAGGAGGGAGAAAAGGGTCCAGCAAGAGCAATAGTCCAAATGGTCCCAACTCTCTCTCTAATTCACCTTCTTCCCAACTCTCCCAACTCTCGCTTACCTTCCAGAGATGGCTTTT
FRUITFULL	L K K I K E R E K K T D Q Q E G Q L V Q C S N S S - S V L L L P Q Y C V T S S R D G F
L. campestre FUL	L K K I K E R E K K T D Q Q E G Q F I I Q C S N S S N S L L L P Q Y C V T S S R D G L
L. appelianum FUL	L K K I K E R E K K T D Q Q E G Q F I I Q C S N S S N S L L L P Q Y C V T S S R D G F
FRUITFULL	GTTGGAGAGTGGGGAGAGACGGTGGTGGATCGTGTGAGGACCAACTCTCTGCTGGCTTGGATGTTACCTACCTACCTACCGAAGCGAGTAG
L. campestre FUL	ATGGGAGAGTTCGGCAAGAGACGGTGGTGGATCGTGTGAGGACCAACTCTCTCTCGGGCTTGGATGTTACCTACCTACCTACCGAAGCGAGTAG
L. appelianum FUL	ATGGGAGAGTTCGGCAAGAGACGGTGGTGGATCGTGTGAGGACCAACTCTCTCTCGGGCTTGGATGTTACCTACCTACCTACCGAAGCGAGTAG
FRUITFULL	V E R V G G E N G G A S S L T E P N S L L P A W M L R P T T T N E *
L. campestre FUL	M E R I G Q E N G G A P S L T E P N S L L P A W M L R P - T T N E *
L. appelianum FUL	V E R I G Q E N G G A P S L T E P N S L L P A W M L R P - T T N E *

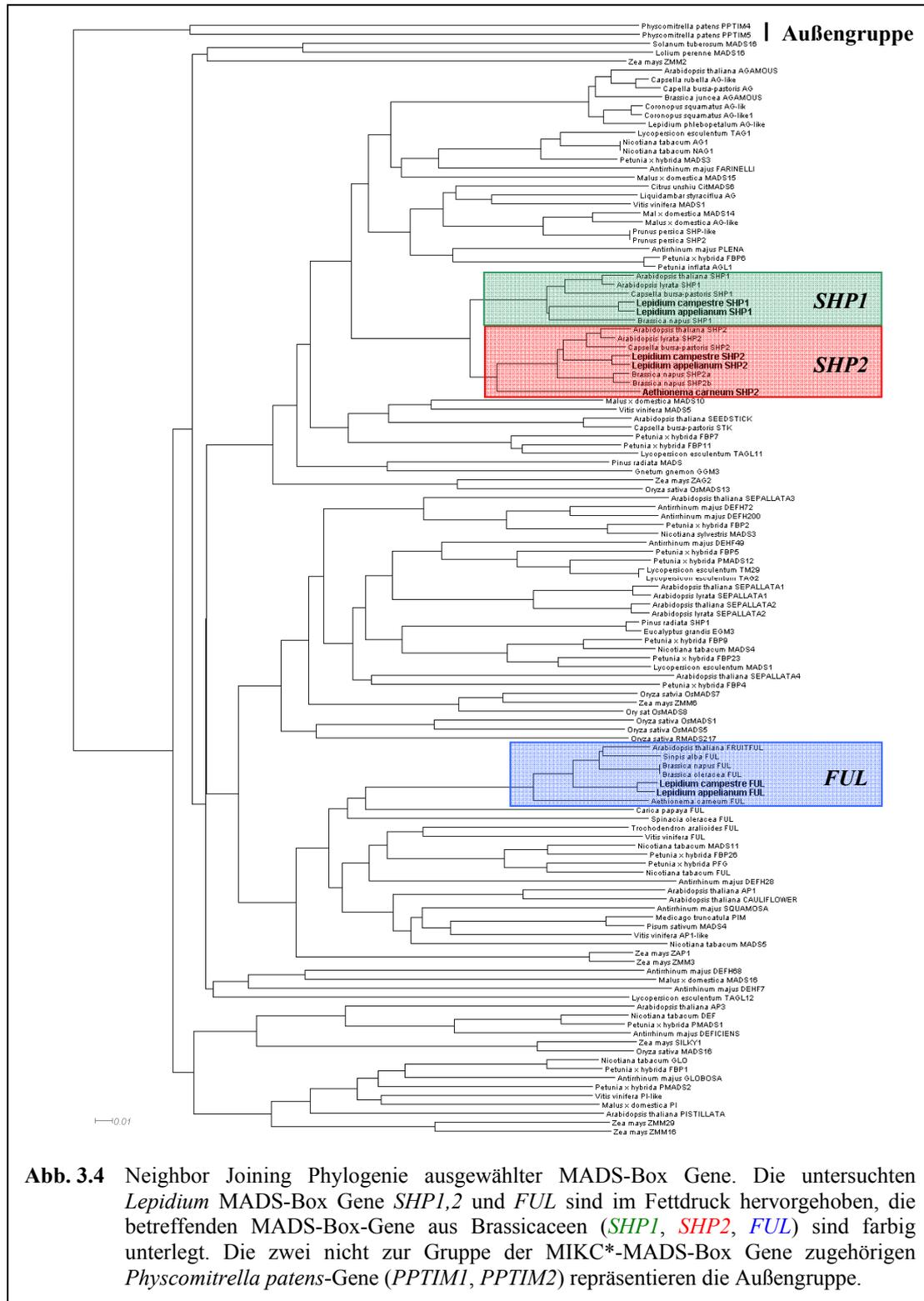
Abb. 3.3c Alignment der Nukleotidsequenzen sowie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *FRUITFULL* (*Arabidopsis thaliana*) sowie der mutmaßlich orthologen Gene aus *Lepidium campestre* (Öffnungsfrüchte) und *Lepidium appelianum* (Schließfrüchte). Synonyme Nukleotid-Substitutionen sind grün markiert, nicht-synonyme Nukleotid-Substitutionen sowie die resultierenden Aminosäure-Substitutionen sind rot dargestellt. Pfeile kennzeichnen Aminosäure-Substitutionen, die ausschließlich bei *Lepidium appelianum* mit indehiszenten Früchten vorhanden sind. Die MADs-Box ist im Fettdruck dargestellt.



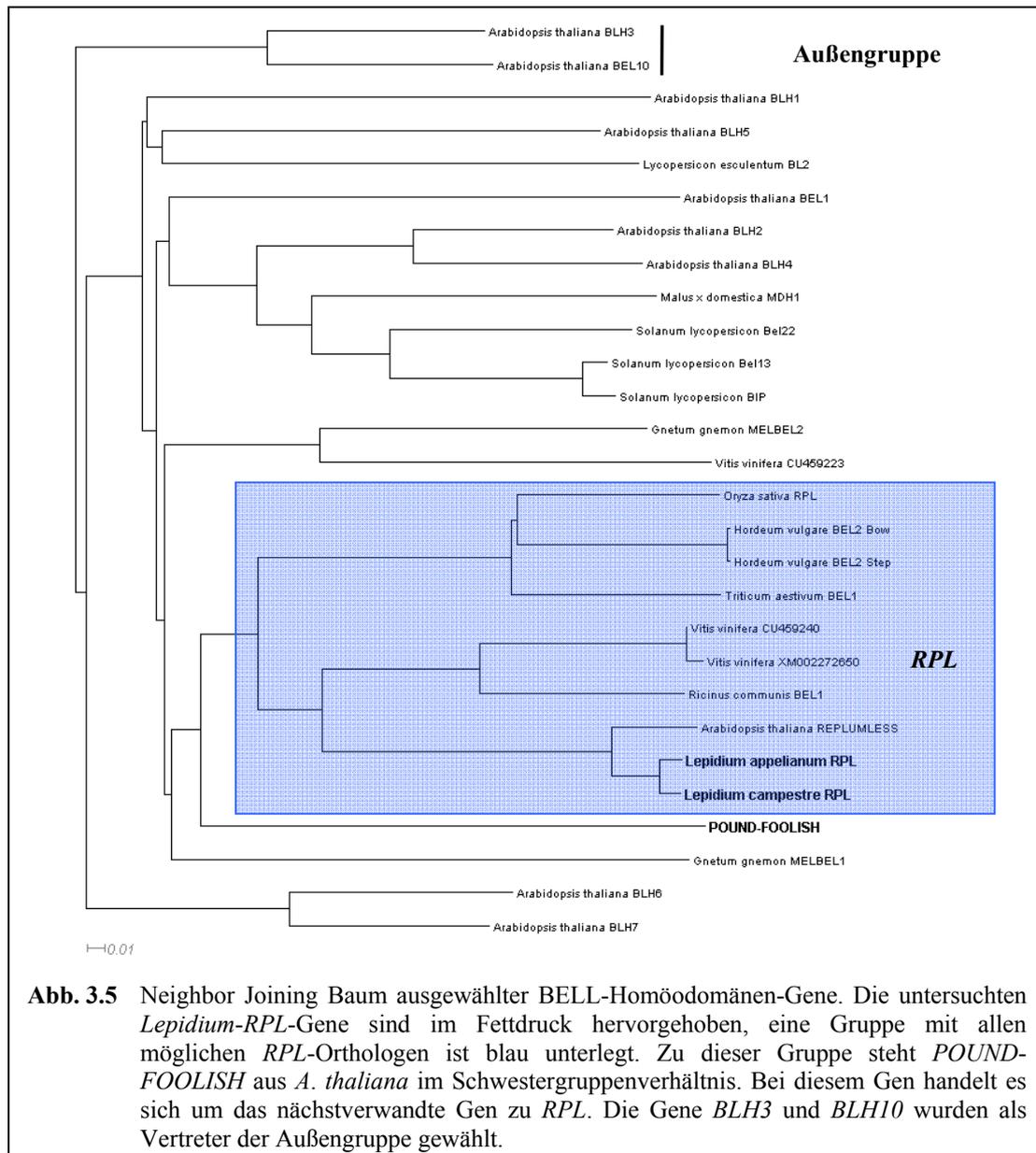


### 3.3.1 Neighbor Joining Analysen der Fruchtentwicklungsgene

Neighbor Joining Bäume sind in **Abb. 3.4** (MADS-Box Gene) und **Abb. 3.5** (BELL-Gene) dargestellt. Bereits bei diesen schnellen Analysen ist gut zu erkennen, dass die untersuchten Gene (*SHP1*, *2*, *FUL*, *RPL*) aus *Lepidium* in Schwesterbeziehung mit den Orthologen aus *Arabidopsis* und anderen Brassicaceen stehen.



**Abb. 3.4** Neighbor Joining Phylogenie ausgewählter MADS-Box Gene. Die untersuchten *Lepidium* MADS-Box Gene *SHP1*, *2* und *FUL* sind im Fettdruck hervorgehoben, die betreffenden MADS-Box-Gene aus Brassicaceen (*SHP1*, *SHP2*, *FUL*) sind farbig unterlegt. Die zwei nicht zur Gruppe der MIKC\*-MADS-Box Gene zugehörigen *Physcomitrella patens*-Gene (*PPTIM1*, *PPTIM2*) repräsentieren die Außengruppe.



**Abb. 3.5** Neighbor Joining Baum ausgewählter BELL-Homöodomänen-Gene. Die untersuchten *Lepidium*-RPL-Gene sind im Fettdruck hervorgehoben, eine Gruppe mit allen möglichen RPL-Orthologen im Fettdruck hervorgehoben, eine Gruppe mit allen möglichen RPL-Orthologen ist blau unterlegt. Zu dieser Gruppe steht *POUND-FOOLISH* aus *A. thaliana* im Schwestergruppenverhältnis. Bei diesem Gen handelt es sich um das nächstverwandte Gen zu RPL. Die Gene *BLH3* und *BLH10* wurden als Vertreter der Außengruppe gewählt.

### 3.3.2 Bayesische- und Bootstrap-Analysen der Fruchtentwicklungsgene

Sowohl für den MADS-Box- als auch für den BELL-Datensatz wurde das beste Substitutionsmodell ermittelt (GTR+G+I). Nach Berechnung von 1.700.000 Generationen (MADS-Box-Phylogenie) bzw. 1.000.000 (BELL-Phylogenie) und anschließendem „Verbrennen“ von 25% der initialen Bäume (burn-in) wurden 50% Majority-Rule-Konsensus-Bäume erstellt. Diese sind in **Abb. 3.6** (MADS-Box Phylogenie) und in **Abb. 3.7** (BELL-Phylogenie) abgebildet.

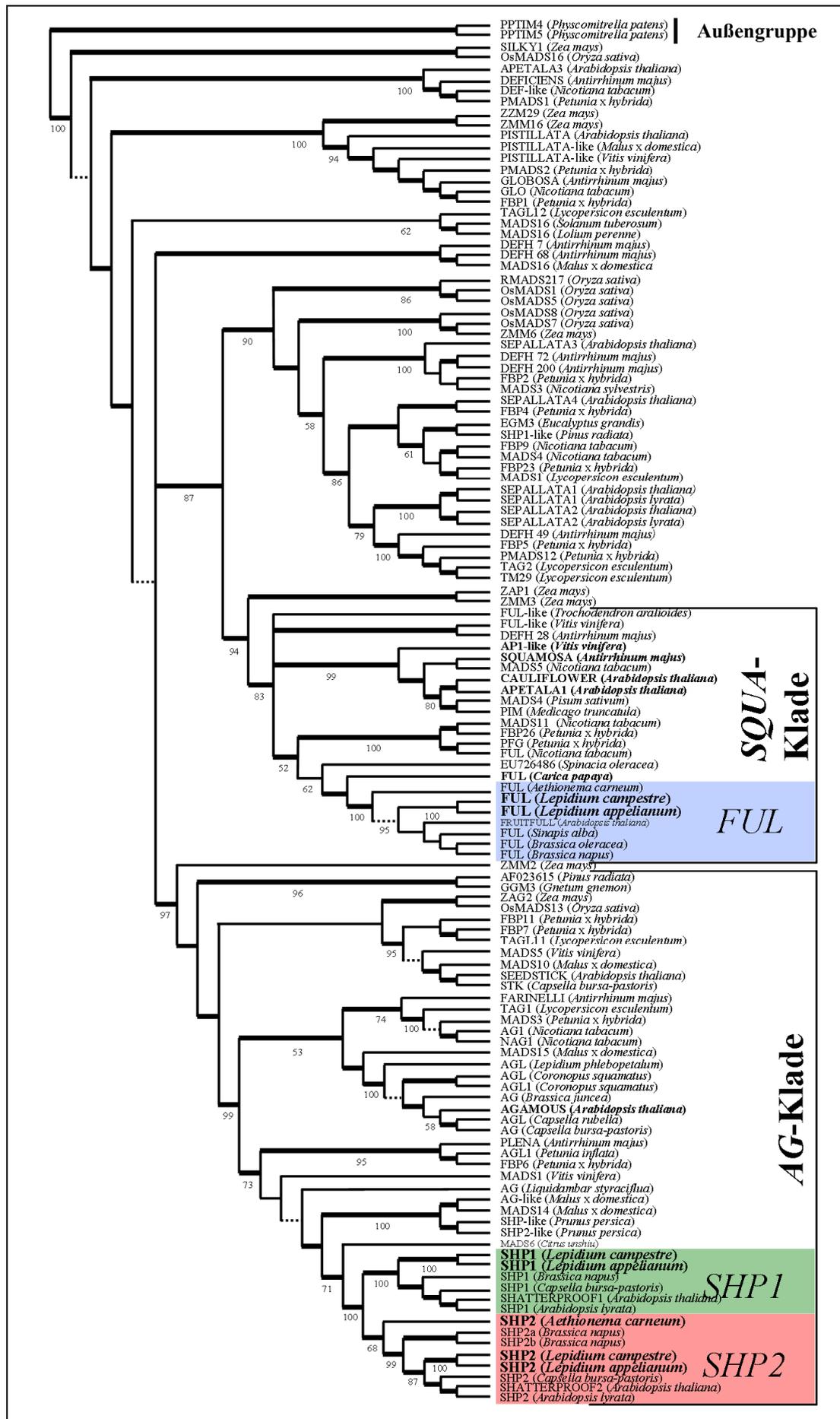
Sowohl die Bayesische als auch Neighbor Joining Analysen zeigen sehr ähnliche Topologien, und auch der „Bootstrap-majority-rule-consensus“-Baum zeigt nur geringe Unterschiede zu den Bayesischen Untersuchungen. Aus diesem Grunde wurde auf die Darstellung der „Bootstrap-majority-rule-consensus“-Bäume verzichtet, vielmehr wurden Bootstrap-Werte für wichtige Kanten auf die Bayesischen Phylogenien übertragen. Die Bootstrap-Werte sind unterhalb der jeweiligen Kladen angegeben.

### 3.3.2.1 MADS-Box Phylogenie

Die Berechnung der MADS-Box Phylogenie erfolgte in ersten Analysen zunächst unter Einbeziehung von *AP2*-like-Genen, welche zur Bewurzelung der Phylogenie durch Außengruppenvergleich herangezogen wurden. Hierbei stellte sich heraus, dass die *Physcomitrella patens* MADS-Box Typ I Gene *PPTIM4* und *PPTIM5* im Schwestergruppenverhältnis zu den MIKC\*-MADS-Box-Genen stehen. Durch die entferntere Verwandtschaft der *AP2*-like Gene zu den MIKC\*-MADS-Box Genen wurde das Alignment komplexer, was zu deutlich längeren Rechenzeiten bei den Stammbaumrekonstruktionen führte. Um Rechenzeiten zu minimieren, wurden daher die *AP2*-Gene aus dem Alignment eliminiert und die *Physcomitrella*-Gene MADS-Box Typ I Gene zur Bewurzelung der MIKC\*-MADS-Box Genphylogenie (über Außengruppenvergleich) verwendet.

In der MADS-Box Phylogenie (**Abb. 3.6**) lassen sich verschiedene Unterfamilien unterscheiden. Eine größere Gruppe (SQUA-Klade) enthält alle *FRUITFULL*-like Gene sowie eine hierzu im Schwestergruppenverhältnis stehende Gruppe mit den *Arabidopsis*-Genen *CAULIFLOWER* (*CAL*) und *APETALA1* (*API*), das dazu Orthologe Gen *SQUAMOSA* aus *Antirrhinum majus* (*SQUA*) sowie weitere Orthologe aus anderen Gattungen, wie z.B. ein *API*-like Gen aus *Vitis vinifera* (AY538746).

**Abb. 3.6** Bayesische Phylogenie von 125 MADS-Box-Genen. Zum Außengruppenvergleich dienen zwei Typ I MADS-Box-Gene aus *Physcomitrella patens* (*PPTIM4*, *PPTIM5*). Posterior Propability-Werte (PP) > 0.95 sind als fette Linien, 0.95 > PP > 0,8 als normale und niedrigere PP-Werte als gestrichelte Linien dargestellt. Bootstrap-Werte wichtiger Kladen sind unterhalb der betreffenden Kante angegeben. Die untersuchten Fruchtentwicklungsgene aus *Lepidium* (*SHP1*, *SHP2* und *FUL*) stehen im Schwestergruppenverhältnis zu den jeweiligen Fruchtentwicklungsgenen aus *Arabidopsis*. *FUL*-like Gene unterschiedlicher Brassicaceen-Taxa sind blau unterlegt. Im Schwesterverhältnis zu diesen steht mit *Carica papaya* *FUL* ein weiteres *FUL*-like Gen aus den Brassicales. *SHP*-Gene verschiedener Brassicaceen-Arten unterteilen sich in die paralogen *SHP1* (grün unterlegt) und *SHP2*-Gene (rot unterlegt). In den jeweiligen Gruppen finden sich auch die untersuchten Gene aus *Lepidium* wieder (Fettdruck). Das *SHP*-Gen aus *Aethionema carneum* steht im Schwesterverhältnis zu den restlichen Brassicaceen-*SHP2*-Genen.



Innerhalb der *FUL*-like Gene finden sich die für die vorliegende Arbeit untersuchten Gene aus *L. campestre* (*LcFUL*) und *L. appelianum* (*LaFUL*) wieder, welche mit *FUL*-Orthologen anderer Brassicaceen zusammen stehen.

Zu den Brassicaceen-*FUL*-Orthologen steht wiederum *CpFUL* (*Carica papaya*, Caricaceae, Brassicales) im Schwestergruppenverhältnis. Dieses scheint ebenso ortholog zu *AtFUL* zu sein.

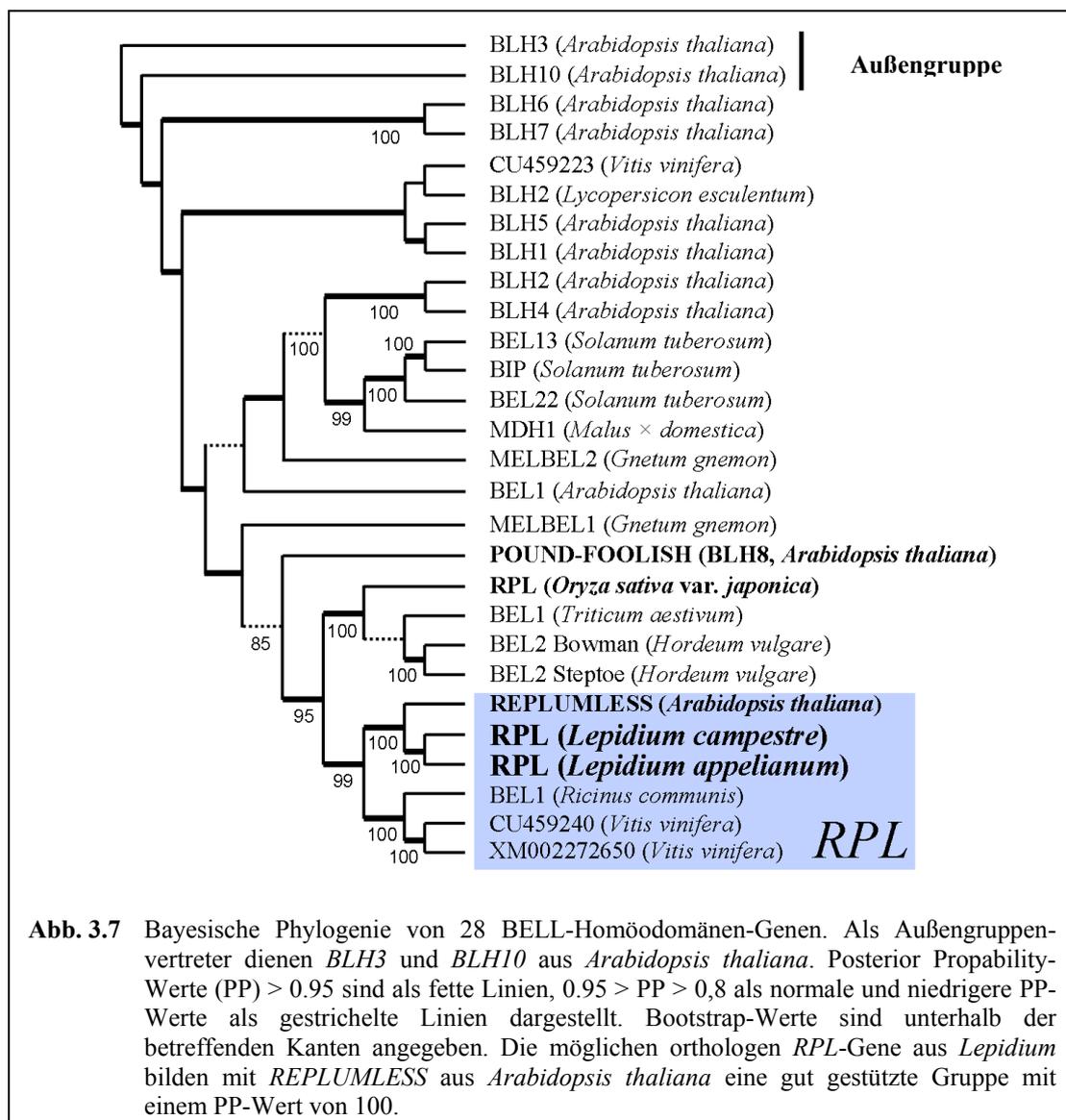
Die statistische Absicherung mit posterior probability Werten (PP) beträgt für die *FUL*-Gruppe 100%, ebenso 100% betragen die PP-Werte für die *CAL/API*-Klade sowie eine Unterstützung von ebenfalls 100% für die Abtrennung von *CAL/API/FUL* gegenüber dem Rest der MADS-Box Gene. Bootstrap-Analysen stützen die hier gezeigte Stellung der Unterfamilien jedoch nur bedingt. Wird die gesamte *FUL/API/CAL*-Gruppe vom Rest der MADS-Box Gene mit 94% und die *CAL/API* sogar mit 99% gestützt, so beträgt der Bootstrap-Wert für die *FUL*-like Gene gerade 52%. Die Brassicaceen-*FUL*-Gene sind hingegen mit einem Wert von 100% gesichert. Die Bootstrap-Werte liegen auch hier etwas niedriger als die PP-Werte, trennen jedoch die Brassicaceen *FUL*-Gene gut gegen die näheren verwandten Gene ab.

Ähnlich ist die Situation der untersuchten *SHP*-Gene, sie werden von der *AGAMOUS*-Gruppe mit einem PP-Wert von 100% getrennt gesehen. Die *SHATTERPROOF*-Gene innerhalb der Brassicaceen zeigen eine Unterteilung in *SHP1* und *SHP2*, die mit einer PP von 100% gestützt wird. Diese zwei Gruppen beinhalten auch die jeweiligen *Lepidium*-Gene, und lassen für die *SHP2*-Gene sogar die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Brassicaceen erkennen (COUVREUR *et al.* 2010; FRANZKE *et al.* 2011)

Das *SHP*-Ortholog von *Aethionema carneum* (*AecSHP*) steht im Schwestergruppenverhältnis zu den *SHP2*-Genen aller anderen Brassicaceen-*SHP2*-Gene, und sollte daher als *AecSHP2* bezeichnet werden. Da kein zweites *Aethionema*-Ortholog gefunden werden konnte, könnte es sich bei *SHP2* um das ancestrale *SHP*-Gen der Brassicaceen handeln. Die Duplikation wäre demnach erst nach der Trennung von *Aethionema* und den übrigen Brassicaceen erfolgt.

### 3.3.2.2 BELL-Phylogenie

In **Abb. 3.7** ist die Phylogenie ausgewählter BELL-Homöodomänen-Gene dargestellt. Die Topologie stellt *LcRPL* und *LaRPL* mit *REPLUMLESS* aus *Arabidopsis thaliana* mit einem PP-Wert von 100% zusammen. Eine Gruppe um *Vitis*- und *Ricinus*-Gene mit einer PP von ebenfalls 100% ist Schwestergruppe zu den *RPL*-Genen der Brassicaceen. Eine weitere Gruppe, zu der auch *OsRPL* gehört (Os01G0848400), ist wiederum mit einem PP-Wert von 100% zu den restlichen BELL-Genen abgetrennt. Im Schwesterverhältnis zu dieser Gruppe mit *RPL*- und *RPL*-like Genen steht *POUND-FOOLISH* (*BLH8*), ein paraloges Gen zu *AtRPL* (SMITH *et al.* 2004). Die phylogenetische Stellung dieser Gene wird mit einem PP-Wert von 100% gestützt.



Die Bootstrap-Werte in der BELL-Homöodomänen-Gen-Phylogenie liegen etwas niedriger als in der MADS-Box-Gen-Phylogenie, unterstützen aber die *RPL*-Gruppe mit Werten von 95% (inklusive aller Poaceen-*RPL*-like-Gene) bis 100% Brassicaceen-*RPL*-Gene) signifikant.

### 3.4 Southern Hybridisierung

Eine Überprüfung auf paraloge Gene bzw. Allele, die mit RACE-Versuchen nicht detektierbar waren, erfolgte mittels Southern Hybridisierungen. Anhand der dabei verwendeten genspezifischen Sonden war es möglich, die Anzahl der Genkopien der untersuchten Gene zu bestimmen.

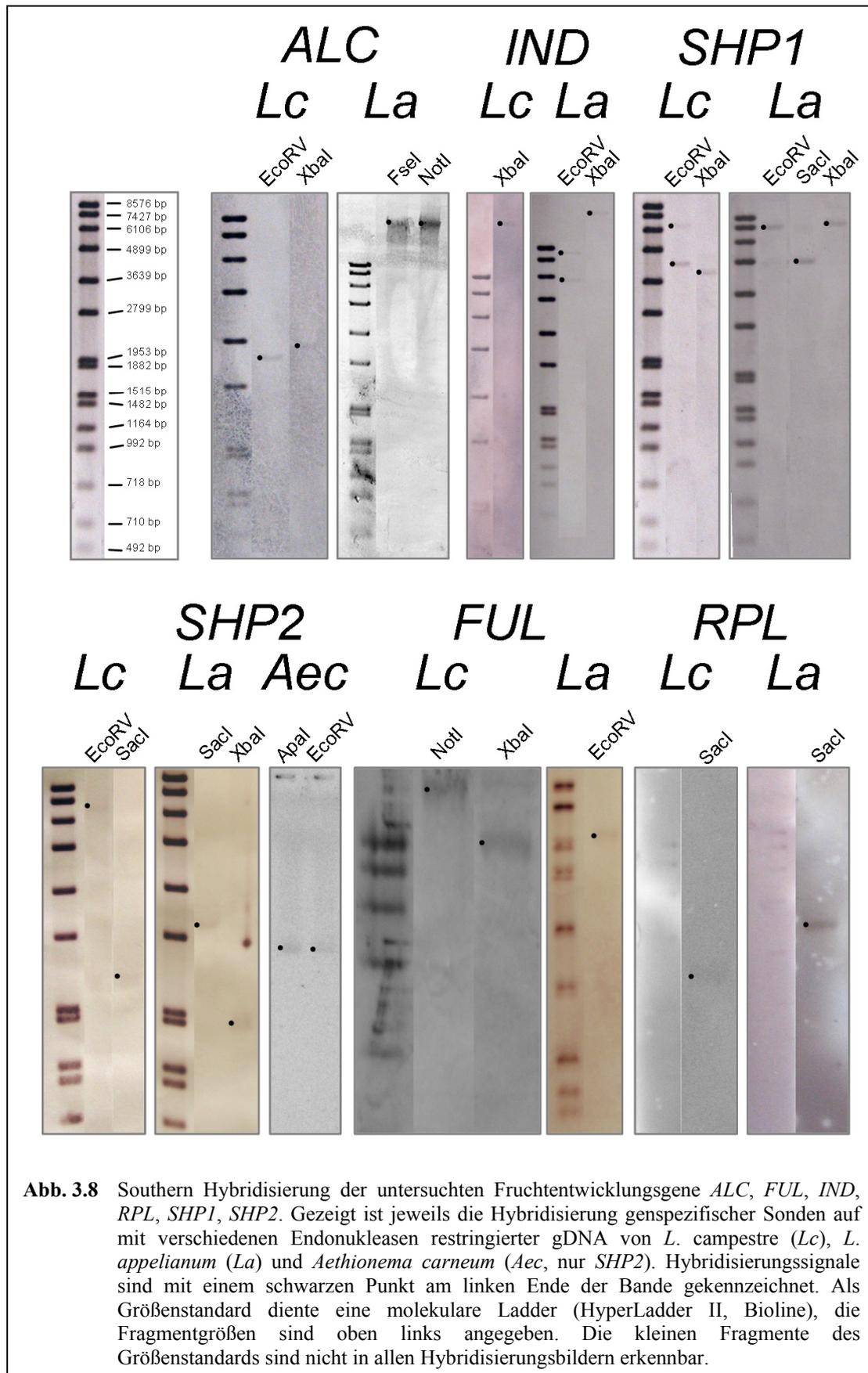
Die Gen-Sequenzen für die Gene *INDEHISCENT* (*LaIND*, *LcIND*) sowie *ALCATRAZ* (*LaALC*, *LcALC*), die zeitgleich in einem Kooperationsprojekt in der Arbeitsgruppe von Günter Theißen (Jena) entstanden, wurden freundlicherweise für *in situ*, Southern und Northern Hybridisierungs-Analysen zur Verfügung gestellt.

Die Hybridisierungsergebnisse sind in **Abb. 3.8** dargestellt. In den meisten Fällen konnten paraloge Gene ausgeschlossen werden, da die Hybridisierung lediglich eine Bande pro Laufspur aufweist. Zwei Ausnahmen sind jedoch bei *LcSHP1* bzw. *LaIND* erkennbar. So sind nach der Restriktion mit EcoRV bei *LcSHP1* zwei Banden zu erkennen (~ 6800bp und ~ 4400bp), die übrigen Laufspuren zeigen jedoch nur je eine Hybridisierungsbande. Der Vergleich mit *LcSHP2* nach EcoRV-Restriktion ergibt hingegen nur eine Bande, die jedoch die gleiche Größe hat wie die größere Bande von *LcSHP1* (~ 6800bp), was den Verdacht auf Kreuzhybridisierung nahelegt.

Ebenfalls zwei Banden sind bei *LaIND* (EcoRV-Restriktion) erkennbar, was zunächst auf ein paraloges Gen oder ein zweites Allel hindeutet. In einer zweiten Laufspur (XbaI-Verdau) ist zwar nur eine einzelne Bande erkennbar, trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass es ein zweites Allel von *LaIND* oder ein paraloges Gen geben könnte, welches per Southern Hybridisierung detektiert wurde.

Das aus *Aethionema carneum* isolierte Gen (*AeSHP2*) lieferte ebenso eine Bande pro Laufspur (**Abb. 3.8**), was auf ein Single-Copy-Gen hindeutet.

Aufgrund der schwachen Hybridisierungssignale gestaltete sich die Auswertung als schwierig. Als Ursachen für die schwachen Signale können verschiedene Gründe in Betracht gezogen werden. So muss das angewandte DIG-System für Southern Hybridisierungen in Frage gestellt werden, da zum Teil bereits nach kurzer immuno-



**Abb. 3.8** Southern Hybridisierung der untersuchten Fruchtentwicklungsgene *ALC*, *FUL*, *IND*, *RPL*, *SHP1*, *SHP2*. Gezeigt ist jeweils die Hybridisierung genspezifischer Sonden auf mit verschiedenen Endonukleasen restringierter gDNA von *L. campestre* (*Lc*), *L. appelianum* (*La*) und *Aethionema carneum* (*Aec*, nur *SHP2*). Hybridisierungssignale sind mit einem schwarzen Punkt am linken Ende der Bande gekennzeichnet. Als Größenstandard diente eine molekulare Ladder (HyperLadder II, Bionline), die Fragmentgrößen sind oben links angegeben. Die kleinen Fragmente des Größenstandards sind nicht in allen Hybridisierungsbildern erkennbar.

logischer Detektion ein beträchtlicher Hintergrund auf den Membranen sichtbar wurde. Allerdings können diese Ursachen auch pflanzenspezifisch sein: so fällt insbesondere bei *L. appelianum* während der DNA-Isolation auf, dass sehr viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe den Reinheitsgrad der isolierten DNA beeinflussten. Das Entfernen dieser Pflanzeninhaltsstoffe während der DNA-Isolation war – bei der großen benötigten DNA-Menge für Southern Hybridisierungen – nicht möglich, so dass bei downstream-Versuchen keine hochsaubere DNA eingesetzt werden konnte.

### 3.5 *in situ* Hybridisierung der untersuchten Fruchtentwicklungsgene

Mittels *in situ* Hybridisierung sollten raum-zeitliche Expressionsmuster der Fruchtentwicklungsgene in *L. campestre* und *L. appelianum* ermittelt werden. Die hierfür verwendeten spezifischen Gen-Sonden variierten in ihrer Länge. Die Etablierung der *in situ* Hybridisierung in der Gattung *Lepidium* erfolgte zunächst mit *Histon4*-Sonden (vgl. 2.7.1). Expressionsnachweise der untersuchten Fruchtentwicklungsgene mittels *in situ* Hybridisierung mit art- und genspezifischen Anti-Sense-Sonden sowie Negativkontrollen mit Sense-Sonden sind in **Abb. 3.9 - 3.14** gezeigt. Alle Gewebe wurden während der Prähybridisierungsbehandlung mit 1 µg/ml Proteinase K anverdaut (vgl. 2.7.7.1), was in der Regel zu guten Ergebnissen führte.

Die Funktionen der untersuchten Fruchtentwicklungsgene lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: in eine Gruppe von Genen, die eine Expression anderer, an der Fruchttöffnung beteiligter Gene fördern können (Fruchtklappenrand-Identitätsgene; *SHP1*, *SHP2*, *IND*, *ALC*) sowie in eine zweite Gruppe mit Genen, die Repressor-Funktion besitzen und die Expression eines bzw. mehrerer Dehiszenzzonen-Identitätsgene zu hemmen vermögen (*FUL*, *RPL*) (vgl. **Abb. 1.3**, genetische Regulation der Fruchttöffnung in *Arabidopsis thaliana*). Diese zwei unterschiedlich fungierenden Gengruppen werden in den nachfolgenden Kapiteln behandelt.

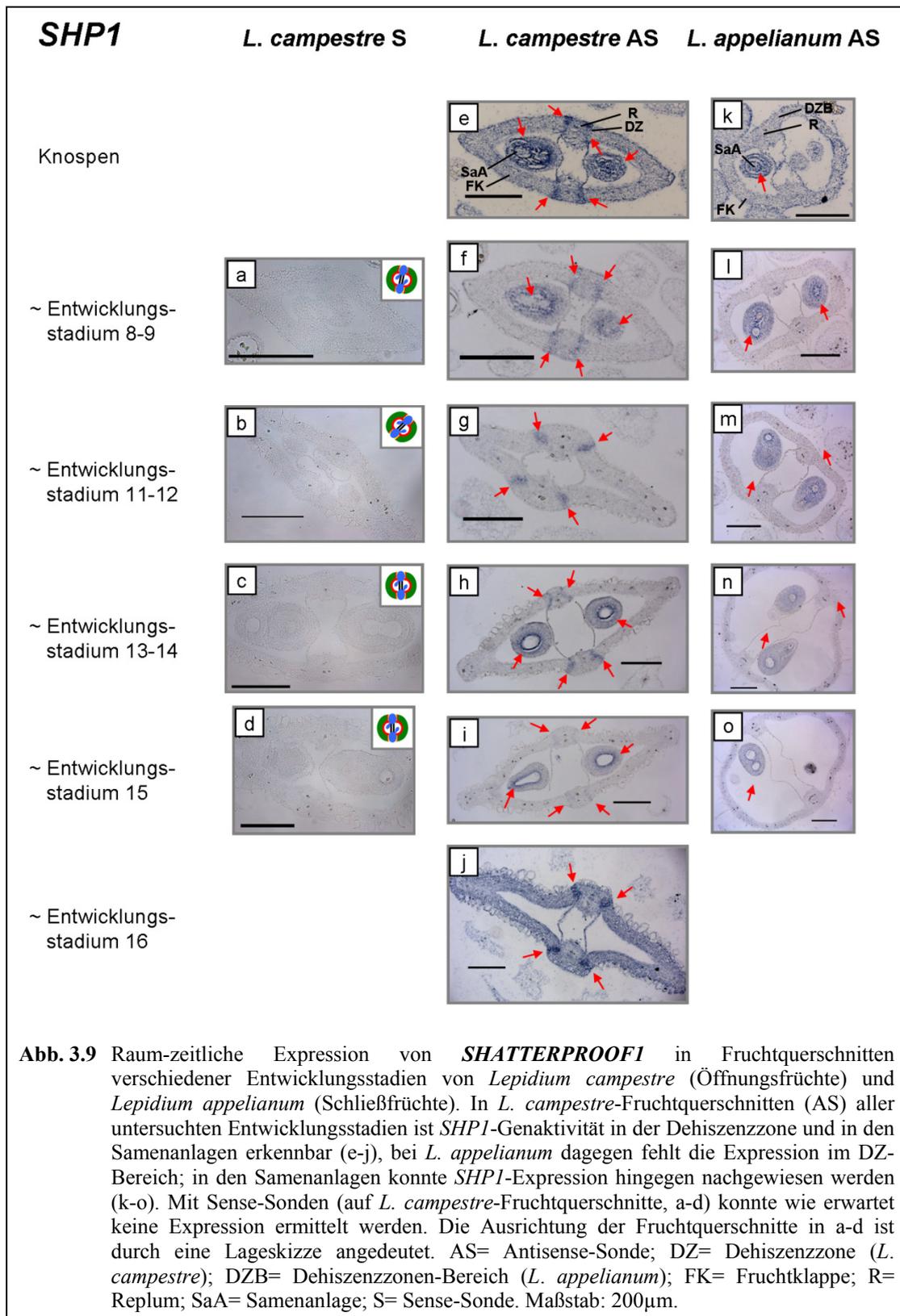
Expressionsdaten konnten zwar für alle Gene ermittelt werden, jedoch waren die *in situ* Hybridisierungsversuche nicht in allen Blüten- und Fruchtstadien erfolgreich. Obwohl die Expressionsdaten nicht vollständig sind, konnte die oben dargestellte Fragestellung jedoch hinreichend bearbeitet werden.

### 3.5.1 Fruchtklappenrand-Identitätsgene

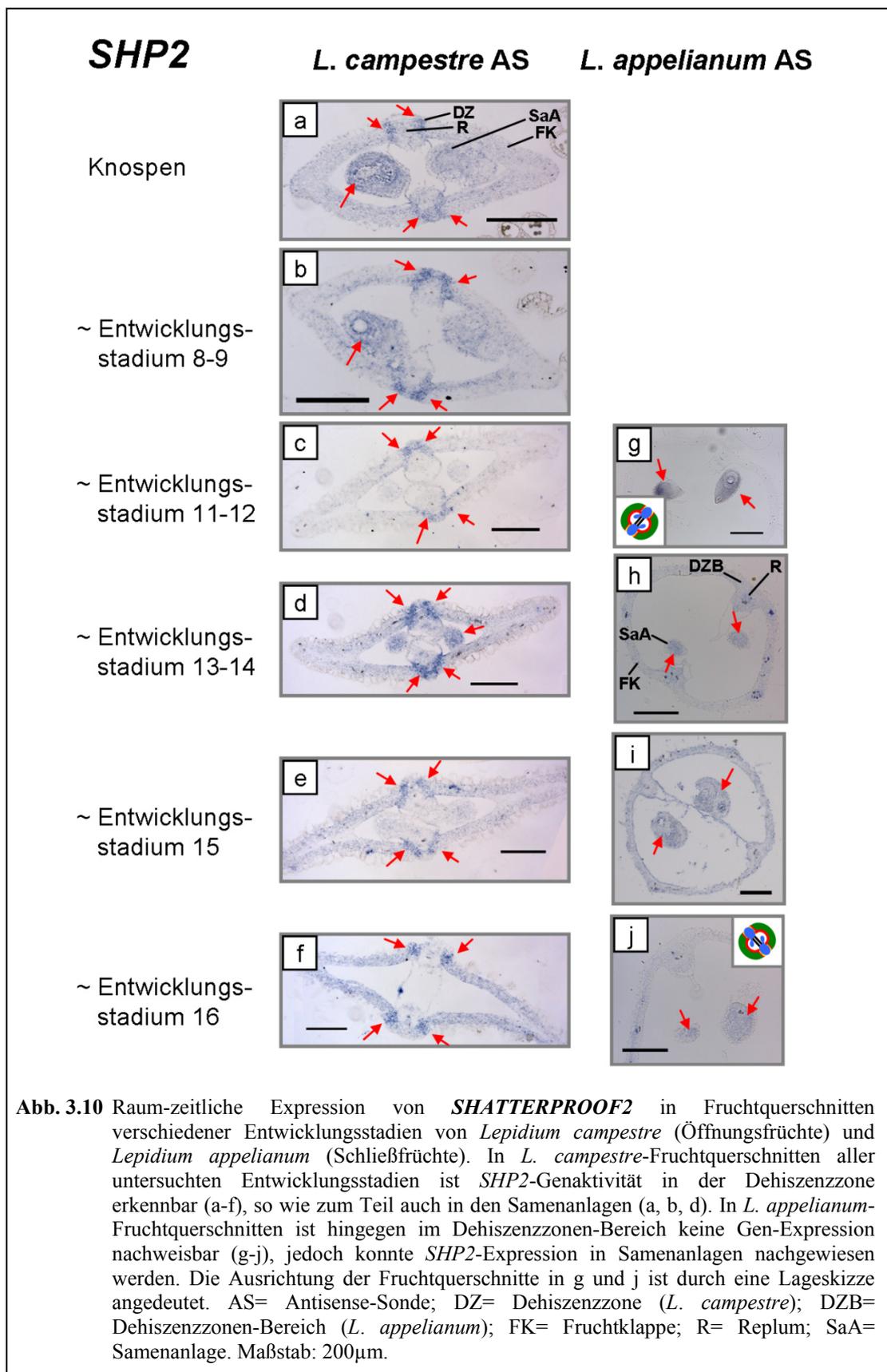
Für die MADS-Box Gene *SHPI* und *SHP2* konnte in der DZ von *L. campestre*-Früchten eine deutliche Expression nachgewiesen werden. Die Expression dieser beiden Gene war in allen untersuchten Altersstadien nachweisbar und auf einen scharf abgegrenzten Bereich, die DZ, beschränkt (**Abb. 3.9 e-j**; **Abb. 3.10 a-f**). Darüber hinaus sind auch Expressionssignale in den Samenanlagen zu beobachten. Die Expression der *SHATTERPROOF*-Gene in Samenanlagen ist auch bei *Arabidopsis* bekannt (MA *et al.* 1991; SAVIDGE *et al.* 1995; FLANAGAN *et al.* 1996). Vergleicht man die Expressionsmuster von *L. campestre* (Öffnungsfrüchte) mit denen von *L. appelianum* (Schließfrüchte), so erkennt man deutliche Unterschiede in der räumlichen Expression. Während der Ontogenese der Schließfrüchte ändern sich die räumlichen Expressionsmuster nicht.

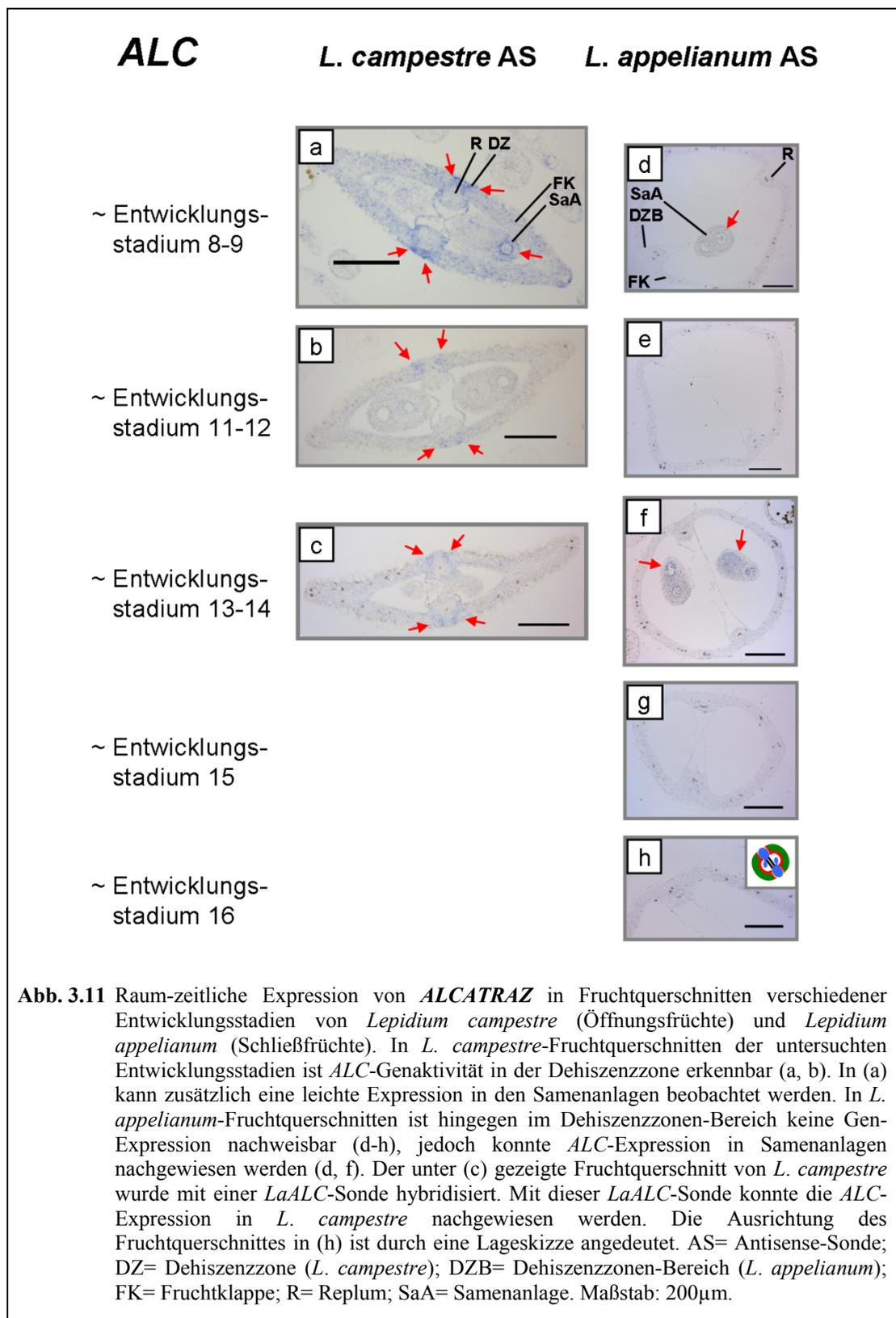
In den histologischen Schnitten von *L. appelianum* erkennt man deutlich die Fruchtklappen, die auf beiden Seiten das Replum miteinander verbinden (**Abb. 3.9 k-o**; **Abb. 3.10 g - j**). Der Bereich, in dem Replum und Fruchtklappenrand miteinander in Verbindung stehen (bei Öffnungsfrüchten als DZ bezeichnet), zeigt bei *L. appelianum*-Früchten bereits auf anatomischer Ebene ein abweichendes Bild im Vergleich zu den *L. campestre*-Früchten (**Abb. 1.4**); eine Dehiszenzzone wird hier nicht ausgebildet (MUMMENHOFF *et al.* 2009). Eine nicht vorhandene mRNA-Akkumulation an den Fruchtklappenrandbereichen wird insbesondere dadurch deutlich, weil Genaktivität der *SHP*-Gene auch in den Samenanlagen dieser Schließfrüchte positive Hybridisierungssignale zeigt.

Eine der Funktionen der *SHP*-Gene in *Arabidopsis* ist die Aktivierung der *IND*- und *ALC*-Expression, welche für die Verholzung der Fruchtklappenrandzellen (*IND*) bzw. der Auflösung der Mittellamellen (*ALC*) verantwortlich sind (vgl. **1.4**). Die Expressionsdaten von *IND* und *ALC* in *L. campestre* (Öffnungsfrüchte) zeigen die aus *Arabidopsis* bekannten und erwarteten Muster. Leider gestaltete sich die Erhebung von Expressionsdaten für *IND* als äußerst schwierig, lediglich in gerade geöffneten Blüten (**Abb. 3.12 a**, ~Entwicklungsstadium 13-14) konnte eine schwache *IND*-Expression detektiert werden, Expressionsdaten von *ALC* liegen zumindest für die Entwicklungsstadien 8-9, 11-12 sowie 13-14 vor (**Abb. 3.11 a - c**).

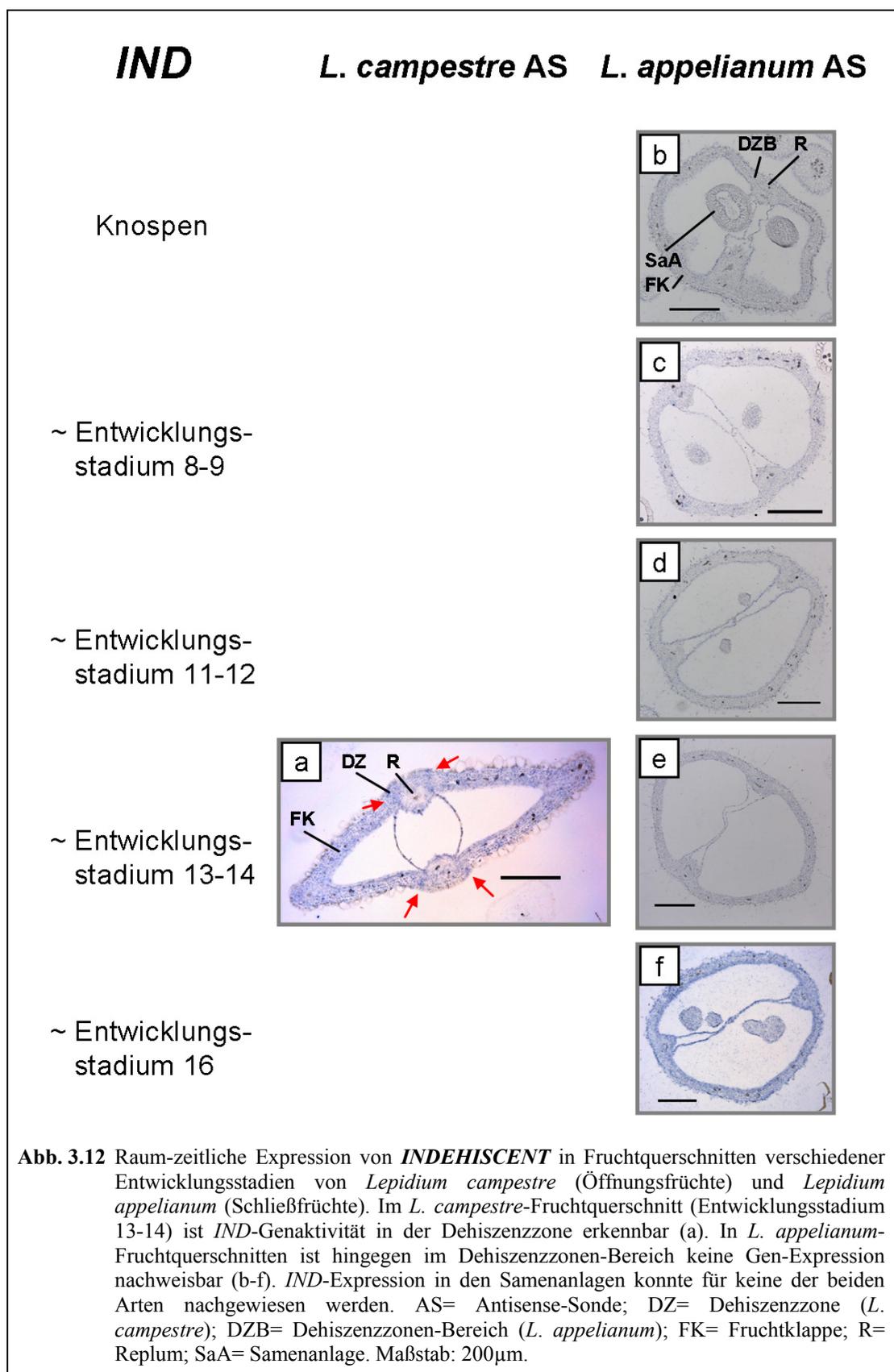


**Abb. 3.9** Raum-zeitliche Expression von *SHATTERPROOF1* in Fruchtquerschnitten verschiedener Entwicklungsstadien von *Lepidium campestre* (Öffnungsfrüchte) und *Lepidium appelianum* (Schließfrüchte). In *L. campestre*-Fruchtquerschnitten (AS) aller untersuchten Entwicklungsstadien ist *SHP1*-Genaktivität in der Dehiszenzzone und in den Samenanlagen erkennbar (e-j), bei *L. appelianum* dagegen fehlt die Expression im DZ-Bereich; in den Samenanlagen konnte *SHP1*-Expression hingegen nachgewiesen werden (k-o). Mit Sense-Sonden (auf *L. campestre*-Fruchtquerschnitte, a-d) konnte wie erwartet keine Expression ermittelt werden. Die Ausrichtung der Fruchtquerschnitte in a-d ist durch eine Lageskizze angedeutet. AS= Antisense-Sonde; DZ= Dehiszenzzone (*L. campestre*); DZB= Dehiszenzonen-Bereich (*L. appelianum*); FK= Fruchtklappe; R= Replum; SaA= Samenanlage; S= Sense-Sonde. Maßstab: 200µm.





**Abb. 3.11** Raum-zeitliche Expression von *ALCATRAZ* in Fruchtquerschnitten verschiedener Entwicklungsstadien von *Lepidium campestre* (Öffnungsfrüchte) und *Lepidium appelianum* (Schließfrüchte). In *L. campestre*-Fruchtquerschnitten der untersuchten Entwicklungsstadien ist *ALC*-Genaktivität in der Dehiszenzzone erkennbar (a, b). In (a) kann zusätzlich eine leichte Expression in den Samenanlagen beobachtet werden. In *L. appelianum*-Fruchtquerschnitten ist hingegen im Dehiszenzonen-Bereich keine Gen-Expression nachweisbar (d-h), jedoch konnte *ALC*-Expression in Samenanlagen nachgewiesen werden (d, f). Der unter (c) gezeigte Fruchtquerschnitt von *L. campestre* wurde mit einer *LaALC*-Sonde hybridisiert. Mit dieser *LaALC*-Sonde konnte die *ALC*-Expression in *L. campestre* nachgewiesen werden. Die Ausrichtung des Fruchtquerschnittes in (h) ist durch eine Lageskizze angedeutet. AS= Antisense-Sonde; DZ= Dehiszenzzone (*L. campestre*); DZB= Dehiszenzonen-Bereich (*L. appelianum*); FK= Fruchtklappe; R= Replum; SaA= Samenanlage. Maßstab: 200µm.



**Abb. 3.12** Raum-zeitliche Expression von *INDEHISCENT* in Fruchtquerschnitten verschiedener Entwicklungsstadien von *Lepidium campestre* (Öffnungsfrüchte) und *Lepidium appelianum* (Schließfrüchte). Im *L. campestre*-Fruchtquerschnitt (Entwicklungsstadium 13-14) ist *IND*-Genaktivität in der Dehiszenzzone erkennbar (a). In *L. appelianum*-Fruchtquerschnitten ist hingegen im Dehiszenzonen-Bereich keine Gen-Expression nachweisbar (b-f). *IND*-Expression in den Samenanlagen konnte für keine der beiden Arten nachgewiesen werden. AS= Antisense-Sonde; DZ= Dehiszenzzone (*L. campestre*); DZB= Dehiszenzonen-Bereich (*L. appelianum*); FK= Fruchtklappe; R= Replum; SaA= Samenanlage. Maßstab: 200µm.

Sowohl die Expression von *IND* als auch die von *ALC* ist bei *L. campestre* auf die DZ beschränkt, wobei eine Expression von *IND* im Endokarp *b* nicht erkennbar ist. Eine

Expression der beiden Gene in den Samenanlagen konnte nicht detektiert werden. Die Expressionsdaten der zwei bHLH-Gene (*ALC*, *IND*) in *L. appelianum* (Schließfrüchte) wiederum zeigen ein anderes Bild. So ist keine Expression der beiden Gene im Bereich der DZ nachweisbar, so wie es auch schon für die *SHP*-Gene beschrieben werden konnte. Allerdings ist zumindest eine schwache Genaktivität von *ALC* in den Samenanlagen erkennbar (**Abb. 3.11 d, f**). Dieses Expressionsmuster von *ALC* in Samenanlagen ist auch in *Arabidopsis* bekannt (RAJANI & SUNDARESAN 2001).

Negativ-Kontrollen mit Sense-Sonden ergaben weder bei *L. campestre*- noch bei *L. appelianum*-Früchten Hybridisierungssignale, was am Beispiel von *LcSHP1* (**Abb. 3.9 a-d**) gezeigt wird. In keinem der untersuchten Stadien, weder im DZ-Bereich noch in den Samenanlagen, war eine RNA-Akkumulation erkennbar, was auch den Erwartungen entsprach.

Positiv- und Funktionalitätskontrollen für die hergestellten *LaIND*- und *LaALC*-Sonden wurden durchgeführt, indem diese Sonden für Hybridisierungen auf *L. campestre*-Gewebe verwendet wurden. Versuche mit *LaIND*-Sonden auf *Lc*-Gewebe ergaben keine positiven Hybridisierungssignale, wie dies auch für Hybridisierungen auf *La*-Gewebe gezeigt werden konnte. Mit *LaALC*-Sonden konnte hingegen eine Expression von *LcALC* im Gewebe nachgewiesen werden (**Abb. 3.11 c**). Diese Hybridisierung – *LaALC*-Sonden auf *Lc*-Gewebe – gleicht den Ergebnissen, die mit *LcALC*-Sonden auf *Lc*-Gewebe erzielt wurden, die Expression von *ALC* ist auf einen schmalen Bereich zwischen dem Replum und dem Fruchtklappenrand beschränkt. Da die übrigen *La*-Sonden (*SHP1*, *SHP2*, *FUL*, *RPL*) Ergebnisse erbrachten, wurden derartige Kontrollen für diese Sonden nicht durchgeführt.

Zusammenfassend zeigen alle Fruchtklappenrand-Identitätsgene in Öffnungsfrüchten von *L. campestre* ganz ähnliche Expressionsmuster, wie sie für *Arabidopsis* Wildtyp-Früchte beschrieben wurden. Demgegenüber liefern die Expressionsdaten für *L. appelianum* mit Schließfrüchten ein abweichendes Bild. Die Expression der vier oben beschriebenen Gene fehlt im Dehiszenzzonen-Bereich gänzlich und gleicht damit vielmehr dem Expressionsmuster verschiedener indehiszenter *Arabidopsis*-Mutanten.

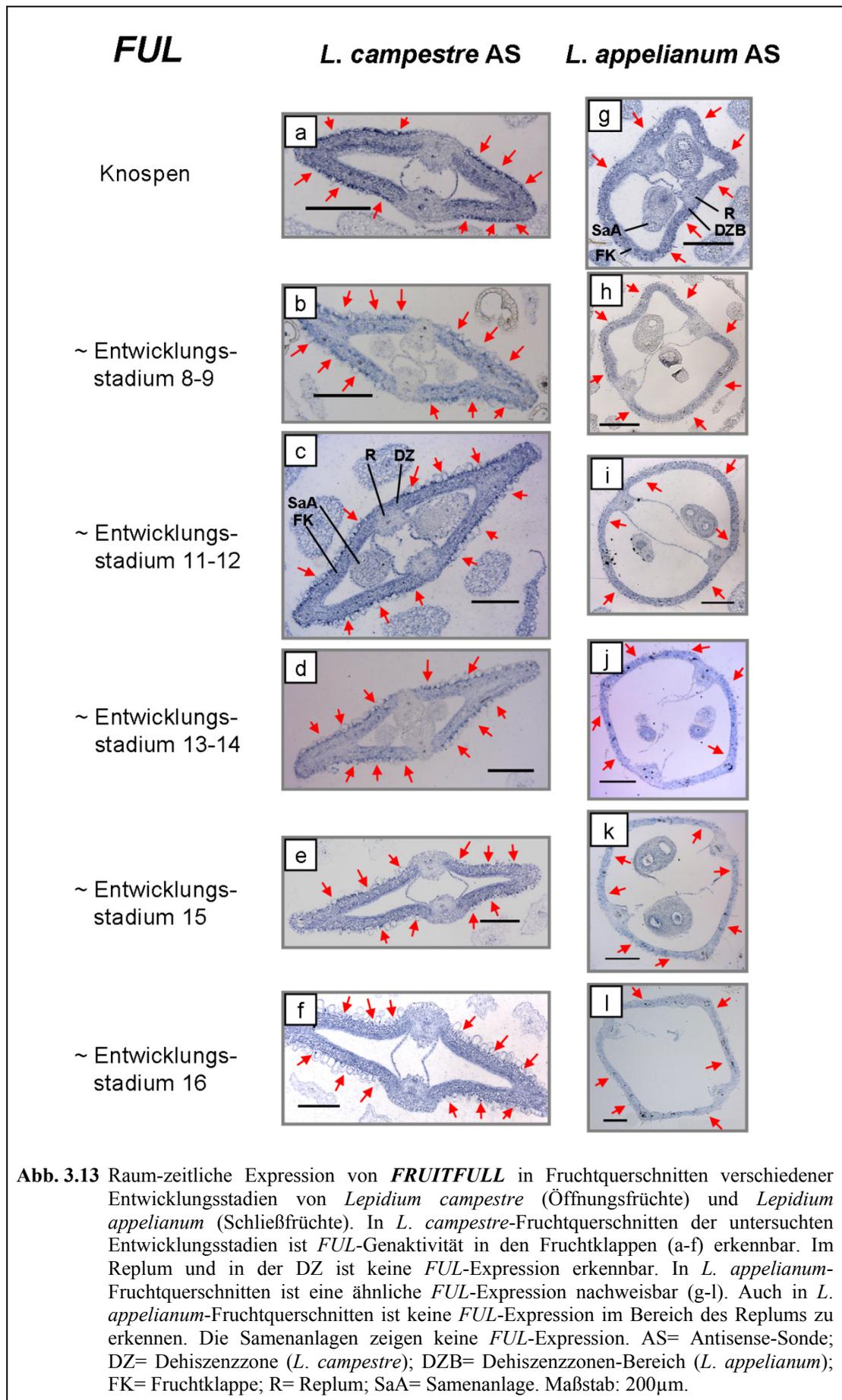
### 3.5.2 Repressorgene *FUL* und *RPL*

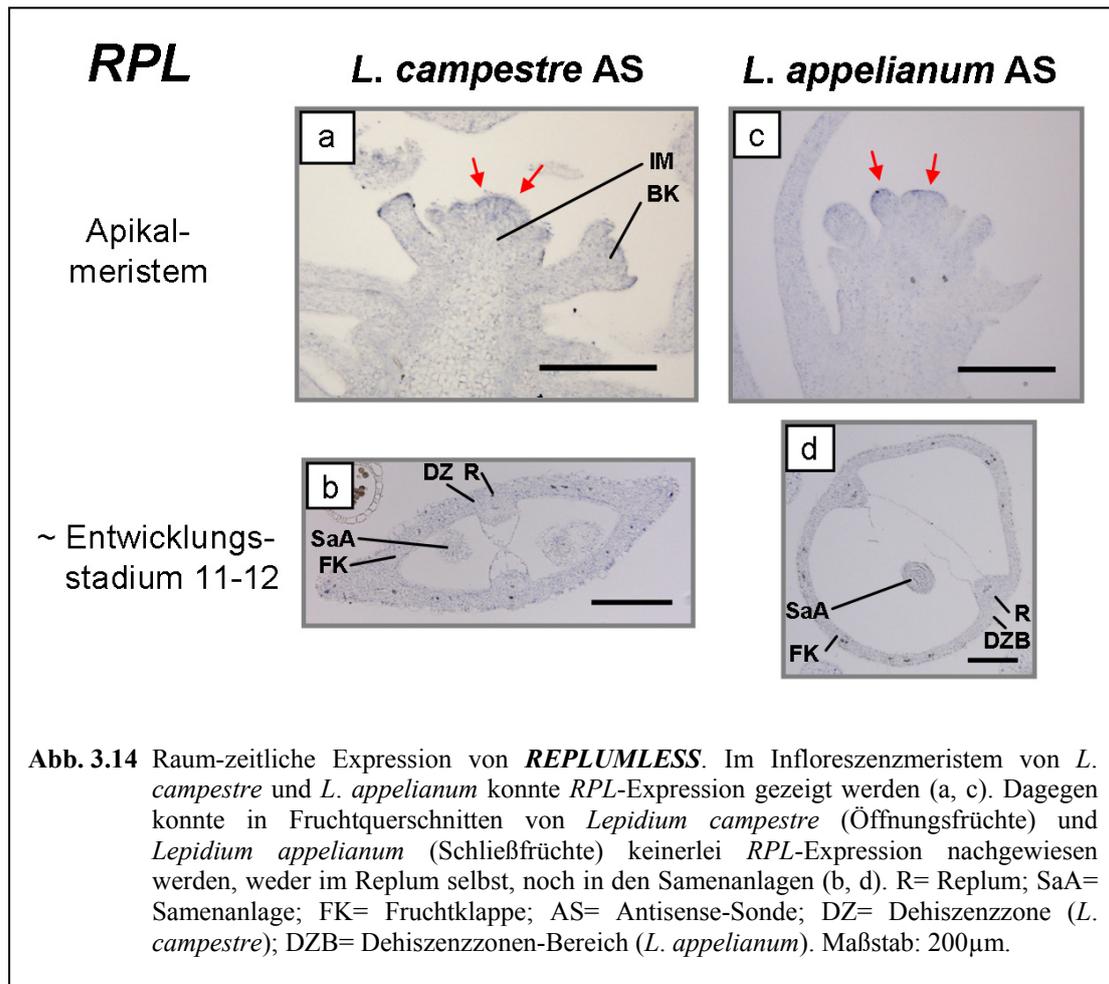
Die Aktivität der Fruchtklappenrand-Identitätsgene wird durch zwei Repressorgene, *FRUITFULL* und *REPLUMLESS*, auf den Bereich der Dehiszenzzone limitiert (vgl. **1.4, Abb. 1.3**). Diese Gene wurden ebenfalls per *in situ* Hybridisierung analysiert, wobei die Ergebnisse getrennt voneinander betrachtet werden müssen.

Die Expressionsdaten von *FUL* sind in den unterschiedlichen Fruchttypen von Öffnungs- und Schließfrüchten sehr ähnlich. In beiden Arten ist die *FUL*-Expression auf den gesamten Bereich der Fruchtklappen ausgedehnt, nur im Bereich der DZ sowie im Bereich des Replums ist keine Gen-Expression detektierbar (**Abb. 3.13**; *Lc*: **a-f**, *La*: **g-l**). Die Expression ist zudem in allen Entwicklungsstadien ähnlich stark, bereits in jungen Blütenknospen ist die Expression ebenso stark wie im Stadium 16, in der die Frucht reife einsetzt.

Komplizierter ist die Bewertung der *RPL*-Expressionsdaten, da in histologischen Schnitten der Entwicklungsstadien 8-16 weder bei Öffnungs- noch bei Schließfrüchten Hybridisierungsergebnisse erzielt werden konnten. Allein in Längsschnitten des Apikalmeristems konnte eine mRNA-Akkumulation von *RPL* nachgewiesen werden (**Abb. 3.14 a, c**); als Beispiel für nicht nachgewiesene Hybridisierung in den Früchten dienen Fruchtquerschnitte des Stadiums 11-12 (**Abb. 3.14 b, d**). In diesen histologischen Schnitten ist keinerlei Hybridisierungssignal zu erkennen.

Mittels *in situ* Hybridisierungen konnten Unterschiede in der Expression mehrerer Frucht-Identitätsgene zwischen dehiszenten *L. campestre*- und indehiszenten *L. appelianum*-Früchten nachgewiesen werden. Der Hauptunterschied war dabei der Nachweis der mRNA-Akkumulation der Fruchtklappenrand-Identitätsgene (*SHP1*, *SHP2*, *ALC* sowie *IND*) in der Dehiszenzzone von Öffnungsfrüchten (*L. campestre*), im Gegensatz zur gänzlich fehlenden Expression dieser Gene in den Fruchtklappenrandbereichen nahe des Replums – eine Dehiszenzzone ist hier nicht ausgebildet – in den Schließfrüchten von *L. appelianum*. Die zwei Repressor-Gene (*FUL* und *RPL*) hingegen weisen augenscheinlich keine unterscheidbaren Expressionsmuster in den beiden Fruchttypen (Öffnungs- bzw. Schließfrüchte) auf. Bei zumindest drei der sechs untersuchten Gene in *L. appelianum* (*SHP1*, *SHP2*, *ALC*) kann die nachgewiesene Expression in den Samenanlagen als Positiv-Kontrolle angesehen werden.

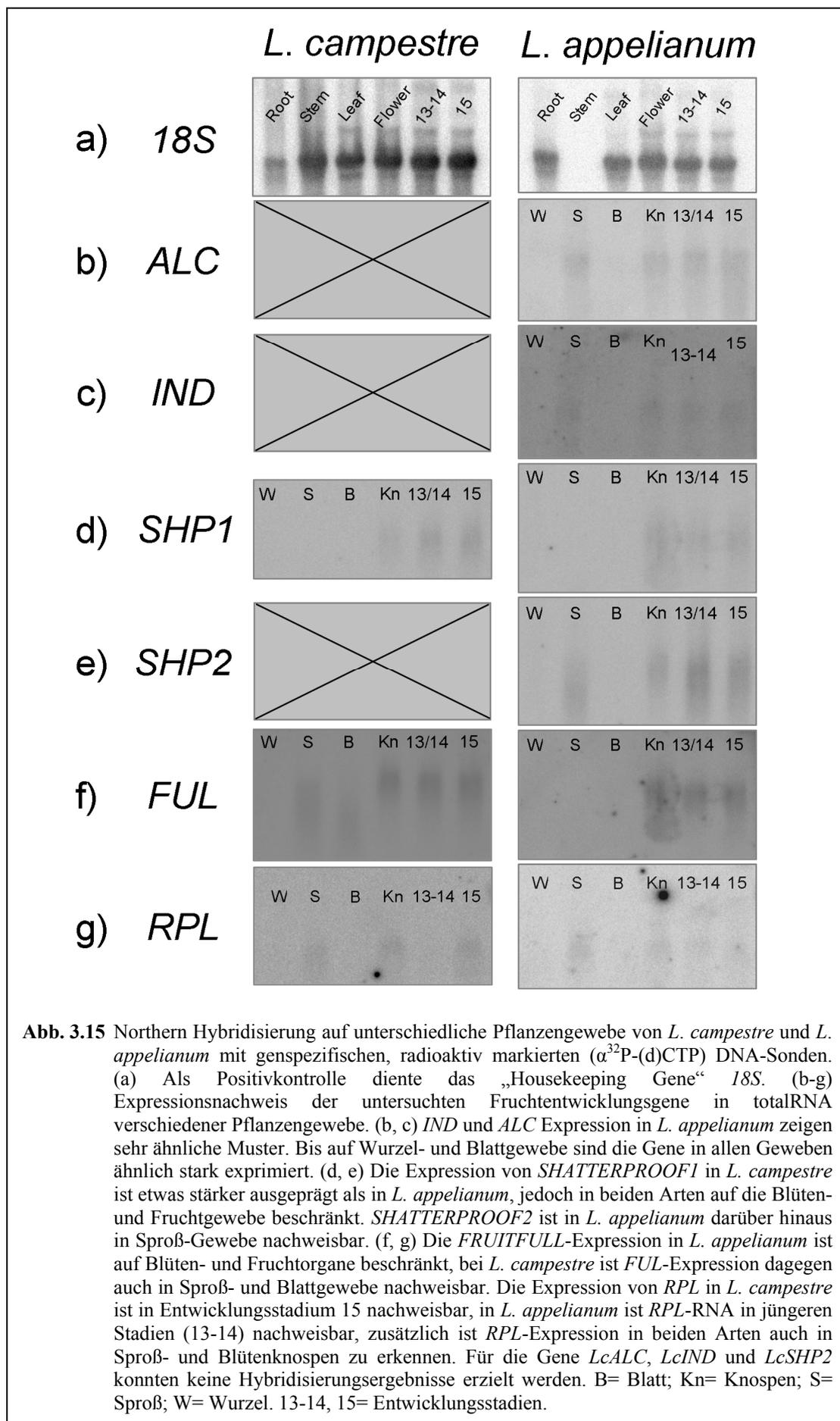




### 3.6 Northern Hybridisierung der Fruchtentwicklungsgene

Um die Genexpression der untersuchten Fruchtentwicklungsgene in unterschiedlichen Pflanzengewebe zu analysieren, wurden Northern Hybridisierungsversuche durchgeführt. Dabei konnten für das „Housekeeping Gene“ *18S* gleichmäßige Expressionsergebnisse sowohl in *L. campestre* als auch in *L. appelianum* in den verschiedenen untersuchten Geweben erkannt werden. (Abb. 3.15 a). Diese sehr ähnlichen Expressionsmuster in *L. campestre* und *L. appelianum* sind auch in den anderen untersuchten Genen erkennbar.

Die Expression der *SHATTERPROOF*-Gene (Abb. 3.15 d, e) in den verschiedenen Geweben ist recht ähnlich. So ist die Expression in beiden untersuchten Arten hauptsächlich auf die Infloreszenzregion beschränkt, wobei die Signale im Gewebe von *L. campestre* (Öffnungsfrüchte) etwas stärker sind. Für das Gen *SHP2* liegen leider nur Ergebnisse für *L. appelianum* vor, dieses Gen ist neben der Expression in der Infloreszenzregion zusätzlich im Spross exprimiert.



Die Ergebnisse für die Repressor-Gene in den verschiedenen Geweben zeigen unterschiedliche Expressionsmuster. So ist *FUL* in *L. campestre* neben der relativ starken Expression im Infloreszenzgewebe (Blüten, Entwicklungsstadium 13-15) auch in Spross- und Blattgewebe exprimiert (**Abb. 3.15 f**). Anders ist dies bei *L. appelianum*, wo die Expression auf die Infloreszenzregion beschränkt ist. Trotz der insgesamt sehr schwachen Signale für das BELL- Homöodomänen-Gen *RPL* ist eine Hybridisierung in Spross- und Blütengewebe erkennbar (**Abb. 3.15 g**). Die Expression in späteren Blüten- und Fruchtstadien verläuft in den zwei Arten unterschiedlich; in *L. campestre* ist eine Expression im Stadium 15 zu erkennen, wohingegen in *L. appelianum* in diesem Stadium keine Expression mehr sichtbar ist. Eine Expression ist hier, wenn auch nur sehr schwach, in etwas früheren Stadien (13-14) zu erkennen.

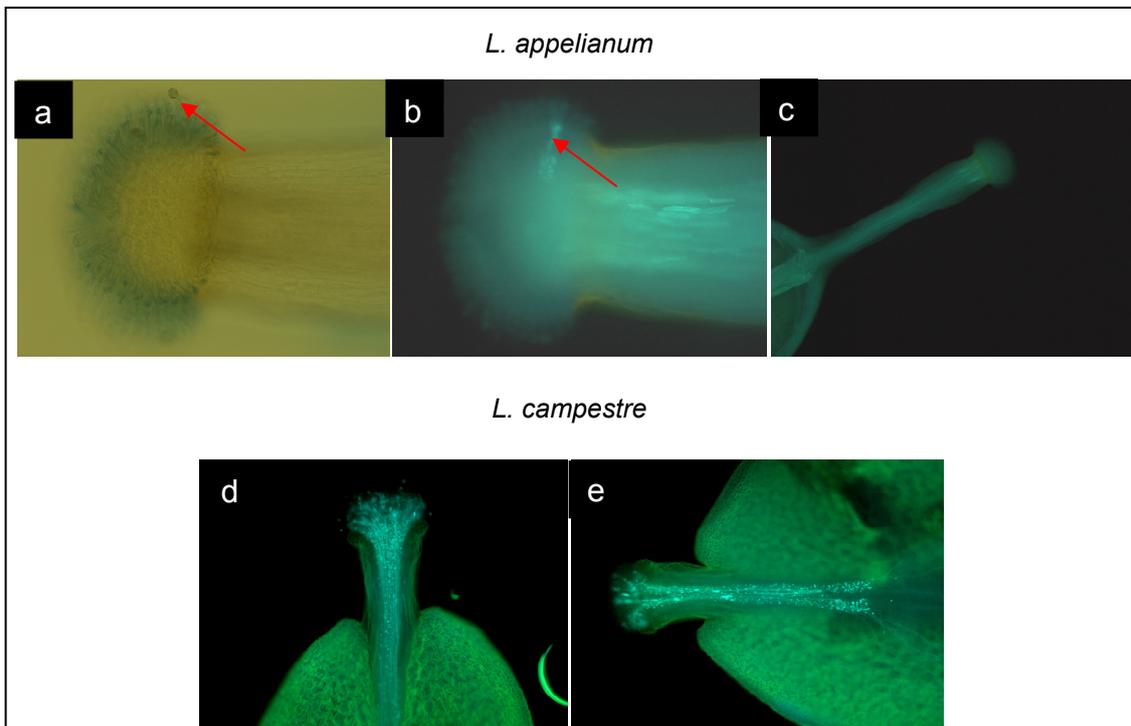
Die Expression der bHLH Gene *ALC* und *IND* in *L. appelianum* ist in allen Blüten- und Fruchtgeweben ausgeprägt, ebenso ist eine Expression beider Gene im Spross zu erkennen (**Abb. 3.15 b, c**). In Wurzel- und Blattgewebe sind diese Gene nicht exprimiert.

Hybridisierungen für das MADS-Box Gen *SHP2* sowie die zwei bHLH Gene *ALC* und *IND* aus *Lepidium campestre* erbrachten keine Ergebnisse (**Abb. 3.15 b, c, e**). Ursachen für diese nicht gelungenen Hybridisierungsversuche könnten unter anderem auf fehlerhafter Sonden-Herstellung beruhen. Haben die Gen-Sonden beispielsweise nicht die erforderliche Länge, so können diese bei Hybridisierungstemperaturen von 65°C (vgl. **2.9.5**) aufgrund zu hoher Stringenz nicht an die Ziel-RNA binden, was das Ausbleiben von radiografischen Signalen zur Folge hat. Ebenso möglich ist der Einsatz zu stark degenerierter RNA bereits bei der Auftrennung der RNA im denaturierenden Agarosegel (vgl. **2.9.2**); dies würde jedoch nicht die positiven Hybridisierungsergebnisse für die übrigen Gen-Sonden erklären (*FUL, RPL, SHP1*).

Die Northern-Ergebnisse sind im Einklang mit entsprechenden Ergebnissen der real-time-PCR Versuche in den Laboren von Günter Theißen (Universität Jena). Anhand der real-time-PCR Versuche sollte – wie auch mit den Northern Hybridisierungen – die Expression der Fruchtentwicklungsgene in den untersuchten *Lepidium*-Arten untersucht und signifikante Expressionsunterschiede zwischen den *Lepidium*-Arten bestimmt werden.

### 3.7 Versuche zum Pollenschlauchwachstum

Um das Wachstumspotential der Pollen von *L. campestre* und *L. appelianum* auf der jeweiligen Schwesterart (vgl. **Abb. 1.1**) zu testen, wurden Analysen zum Pollenschlauchwachstum durchgeführt. In den Abbildungen findet man Hinweise zur Erklärung der nachfolgend beschriebenen Kreuzungsversuche. Es keimen so gut wie keine *L. campestre*-Pollen auf den Narben von *L. appelianum*. Lediglich das beginnende Wachstum eines Pollens ist zu erkennen, dieses wächst allerdings nur bis in das Narbengewebe, der lange Griffel von *L. appelianum*-Blüten wird vom entsprechenden Pollen nicht erreicht (**Abb. 3.16 a - c**). *L. appelianum*-Pollen keimt zumindest in *L. campestre*-Narben aus, mehrere Pollenschläuche sind hier erkennbar (**Abb. 3.16 d, e**). Ob diese Pollen schließlich zur Befruchtung von *L. campestre*-Samenanlagen führen konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 3.16** Keimung von *L. campestre*-Pollen auf *L. appelianum* Narben (a-c) sowie der umgekehrte Versuchsansatz *L. appelianum*-Pollen auf *L. campestre*-Narben (d, e). (a) Ein Pollenkorn von *L. campestre* ist auf der Narbe von *L. appelianum* zu erkennen (Pfeil). (b) Dasselbe Bild wie in (a) unter fluoreszierendem Licht. Ein Pollenschlauch des keimenden Pollens ist zu erkennen, er wächst jedoch nicht in den Griffel aus. Bei den hell gefärbten, schraubigen Bereichen im Griffel handelt es sich um Leitgewebe. (c) Im Griffel unbestäubter Narben von *L. appelianum* ist kein Pollenschlauchwachstum zu erkennen. (d, e) Im *L. campestre*-Griffel sind Pollenschläuche von *L. appelianum*-Pollen zu erkennen. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass diese letztendlich zur Befruchtung von *L. campestre* Samenanlagen führen.

### 3.8 Kreuzungsversuche zwischen *L. campestre* und *L. appelianum*

Kreuzungsversuche wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die zwei untersuchten *Lepidium*-Arten in der Lage sind, miteinander zu hybridisieren. Abgesehen von der stark unterschiedlichen Fruchttöffnung sind sich die zwei Arten morphologisch recht ähnlich, selbst verschleimende Samen findet man noch immer in beiden Arten.

Die Ergebnisse aus den Kreuzungsexperimenten sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Je nach Mutterpflanze haben die Kreuzungen unterschiedlich viele Samen hervorgebracht. Hierbei ist auffällig, dass alle Früchte, bei denen *L. appelianum* als Mutter diente (neun kreuzbestäubte Blüten), samenlos blieben. Demgegenüber entwickelten die Früchte mit *L. campestre* als Mutter (16 kreuzbestäubte Blüten) bei 32 möglichen (zwei Samen je Frucht) insgesamt 23 Samen. Ein einzelner Same stammt hierbei aus der ersten Kreuzung, 22 Samen konnten bei der zweiten Kreuzung aus den Früchten präpariert werden, von denen zwei deutlich unterentwickelt waren. Die Blüten der Negativkontrolle – ohne jegliche Bestäubung – entwickelten keinerlei Samen aus.

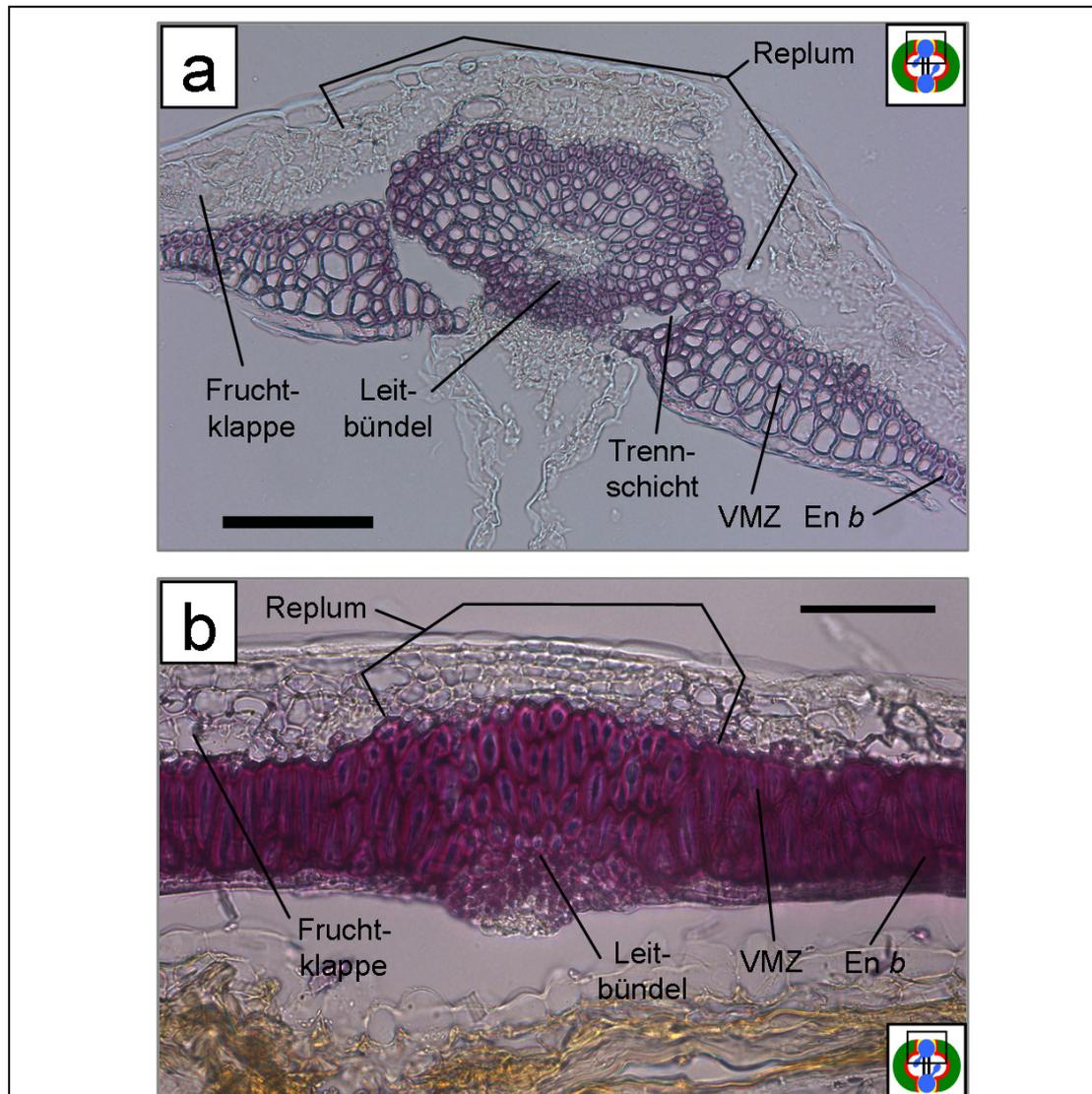
**Tabelle 3.3** Ergebnisse der Kreuzungsversuche. Die Mutterpflanze ist die zuerst genannte Art, Pollen stammen von der als zweites genannten Art. La = *L. appelianum*; Lc = *L. campestre*; ./ = Negativkontrolle (nicht bestäubt).

	La × Lc	Lc × La	La × ./	Lc × ./
1. Kreuzung (15.4.2009)	5 Blüten → keine Samen	3 Blüten → 1 Same	2 Blüten → keine Samen	2 Blüte → keine Samen
2. Kreuzung (27.05.2010)	6 Blüten → keine Samen	13 Blüten → 22 Samen	2 Blüten → keine Samen	2 Blüten → keine Samen
Gesamt	11 Blüten 0 Samen	16 Blüten 23 Samen	4 Blüten 0 Samen	3 Blüten 0 Samen

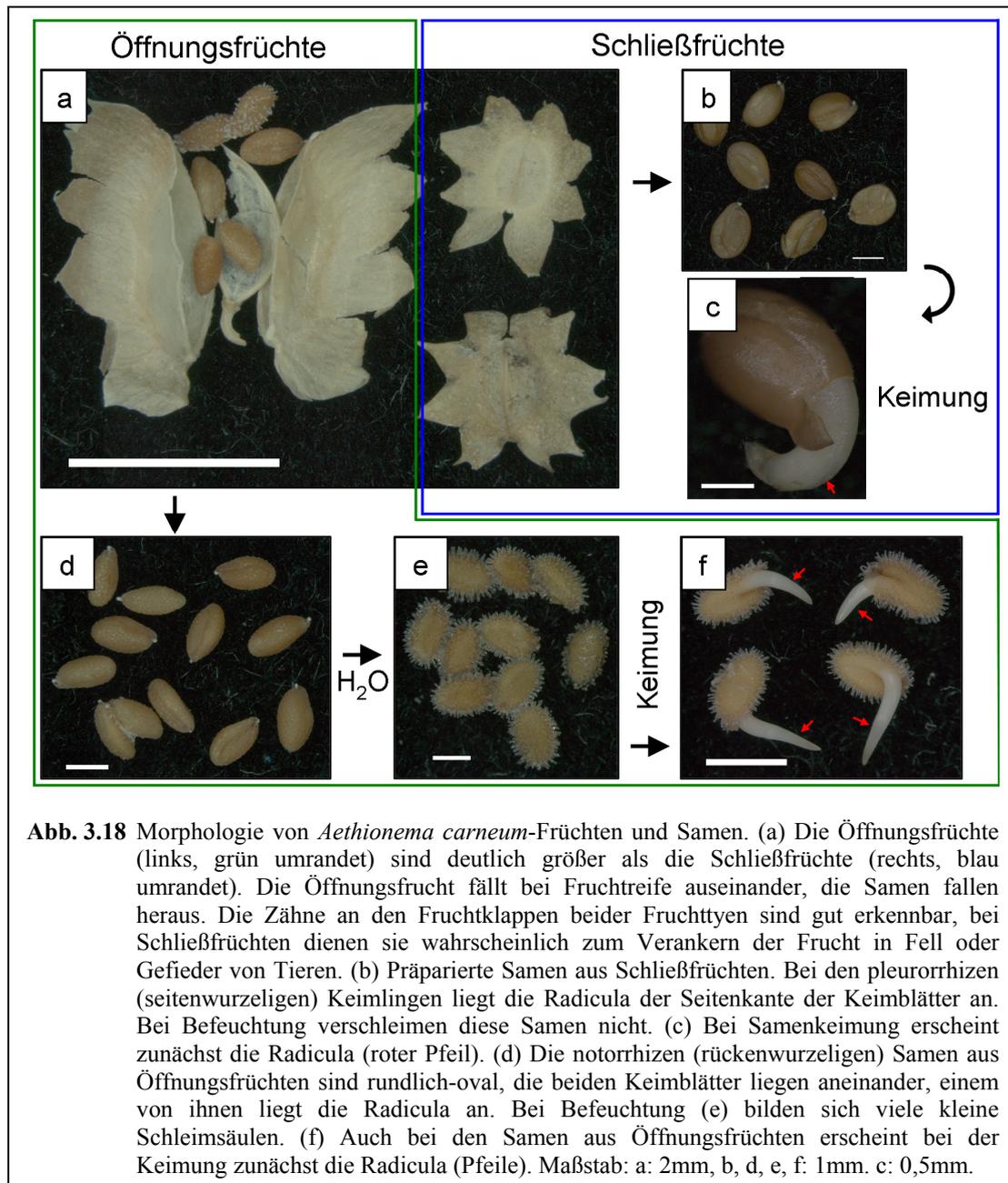
Um Aussagen über eventuelle Hybridisierungsereignisse treffen zu können, wurden alle Samen ausgesät. Die Keimungsrate lag bei 0%; kein einziger Samen ist aufgelaufen, so dass keine Möglichkeit bestand, genetische Analysen mit potentiellen Hybriden durchzuführen.

### 3.9 Anatomie von *Aethionema carneum*-Früchten

Neben den Untersuchungen zur Evolution von Indehiszenz in den Schwesterarten *L. campestre* und *L. appelianum* soll – auch über die Bearbeitungsdauer der vorliegenden Arbeit hinaus – die genetische Regulation von dehiszenten und indehiszenten Früchten in einem einzelnen Fruchtstand (Heterokarpie) studiert werden.



**Abb. 3.17** Fruchtanatomie von *Aethionema carneum* (a) Öffnungs- und (b) Schließfrüchten. (a) Die Anatomie der Öffnungsfrüchte ähnelt der, wie sie für *Aethionema saxatile* beschrieben wurde (POLSTER 2005; MÜHLHAUSEN *et al.* 2008). Das verholzte Endokarp *b* übernimmt zusammen mit einem verholzenden Teil des Mesokarps die Funktion der verholzten Fruchtklappenrandzellen. Zwischen den Fruchtklappen und dem Replum erkennt man eine Trennschicht, entlang derer sich die Fruchtklappen vom Replum lösen. Die Frucht öffnet sich und die Samen werden freigesetzt. (b) Im anatomischen Querschnitt der Schließfrüchte ist keine Trennschicht vorhanden. Das verholzte Endokarp *b* und die verholzten Bereiche des Mesokarps sind starr mit dem Replum verbunden, eine Fruchtöffnung erfolgt nicht. Die Ausrichtung der Fruchtquerschnitte in ist durch Lageskizzen angedeutet. En *b*= Endokarp *b*; VMZ= verholzte Mesokarpzellen. Maßstab: a: 100µm; b: 50µm. Verändert nach KOLKMEYER (2009).



**Abb. 3.18** Morphologie von *Aethionema carneum*-Früchten und Samen. (a) Die Öffnungsfrüchte (links, grün umrandet) sind deutlich größer als die Schließfrüchte (rechts, blau umrandet). Die Öffnungsfrucht fällt bei Fruchtreife auseinander, die Samen fallen heraus. Die Zähne an den Fruchtklappen beider Fruchttypen sind gut erkennbar, bei Schließfrüchten dienen sie wahrscheinlich zum Verankern der Frucht in Fell oder Gefieder von Tieren. (b) Präparierte Samen aus Schließfrüchten. Bei den pleurorrhizen (seitenwurzigen) Keimlingen liegt die Radicula der Seitenkante der Keimblätter an. Bei Befeuchtung verschleimen diese Samen nicht. (c) Bei Samenkeimung erscheint zunächst die Radicula (roter Pfeil). (d) Die notorrhizen (rückenwurzigen) Samen aus Öffnungsfrüchten sind rundlich-oval, die beiden Keimblätter liegen aneinander, einem von ihnen liegt die Radicula an. Bei Befeuchtung (e) bilden sich viele kleine Schleimsäulen. (f) Auch bei den Samen aus Öffnungsfrüchten erscheint bei der Keimung zunächst die Radicula (Pfeile). Maßstab: a: 2mm, b, d, e, f: 1mm. c: 0,5mm.

Um zunächst Kenntnisse über die Fruchtanatomie der heterokarpen *Aethionema carneum* zu erlangen, wurden anatomische Querschnitte von Öffnungs- und Schließfrüchten aus demselben Fruchtstand erstellt und mit Phloroglucin/HCl gefärbt (Abb. 3.17) (KOLKMEYER 2009). Die Anatomie der zwei *Ae. carneum*-Fruchttypen ist vergleichbar mit der von *Ae. saxatile* (POLSTER 2005; MÜHLHAUSEN *et al.* 2008). Die Öffnungsfrüchte zeigen keine identifizierbaren lignifizierten Fruchtklappenrandzellen, vielmehr verholzt ein der Trennschicht benachbarter Bereich des Mesokarps. Die Schließfrüchte von *Ae. saxatile* bilden ebenfalls einen verholzenden Bereich des Mesokarps aus, jedoch erfolgt keine Ausbildung einer

Trennschicht, so dass die verholzten Mesokarp-Zellen in direktem Kontakt mit dem Leitbündel im Replum stehen und eine Fruchttöffnung aufgrund der starren Verbindung nicht erfolgt.

Von Früchten und Samen aus den Nachzuchten von *Aethionema carneum* wurden digitale Fotos erstellt. Die Samen aus Öffnungsfrüchten besitzen eine raue Oberfläche und bildeten nach Befeuchtung rasch viele kleine Schleimsäulen aus. Aus Schließfrüchten präparierte Samen besitzen hingegen eine glatte Oberfläche und verschleimen beim Kontakt mit Wasser nicht. Gut zu erkennen ist der Größenunterschied von Schließ- und Öffnungsfrüchten. Die nur einen Samen beinhaltenden Schließfrüchte haben nur etwa ein Viertel der Größe der Öffnungsfrüchte (**Abb. 3.18**).

## 4 Diskussion

### 4.1 Kreuzungsversuche

Anhand von Kreuzungsexperimenten sollte geprüft werden, ob die zwei untersuchten *Lepidium*-Arten *L. campestre* und *L. appelianum* in der Lage sind, Nachkommen miteinander zu produzieren. In freier Wildbahn ist bislang nichts über Hybridisierung dieser zwei nah verwandten Arten *L. campestre* und *L. appelianum* bekannt und auch zwischen *L. appelianum* und anderen nah verwandten *Lepidium*-Arten mit Schließfrüchten (früher unter anderem auch unter dem Gattungsnamen *Cardaria* geführt) sind keinerlei Hybridbildungen bekannt (FRANCIS & WARWICK 2008). Zwar sind diese nächsten Verwandten von *L. appelianum*, *L. draba* ssp. *draba* und *L. draba* ssp. *chalepense*, tetraploid (MUMMENHOFF *et al.* 2001a), was Hybridisierungsereignisse oder Autopolyploidisierungen in der Vergangenheit voraussetzt, experimentell konnten jedoch keine Hybride erzeugt werden (AL-SHEHBAZ 1986). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen überdies den Schluss zu, dass *L. appelianum* nicht in der Lage ist, zusammen mit *L. campestre* Nachkommen zu produzieren. So wurden bei Kreuzungsversuchen, bei denen *L. campestre* die Mutterpflanze stellte, zwar einige Samen ausgebildet, diese waren jedoch nicht in der Lage zu keimen oder waren bei der Samenreife verkümmert und nicht vollständig ausgebildet. Allerdings kann eine Hybridbildung nicht gänzlich ausgeschlossen werden, die Ergebnisse der Kreuzungsversuche und die Pollenschlauchwachstumsversuche deuten jedoch darauf hin, dass es trotz der nahen Verwandtschaft (MUMMENHOFF *et al.* 2001a; MUMMENHOFF *et al.* 2009) eine nicht überwindbare Reproduktionsbarriere gibt und es im Freiland nicht zu Hybridisierungsereignissen kommt.

Eine Fremdbestäubung von *L. campestre* in freier Natur wird sicherlich auch dadurch erschwert, dass Eigenpollen bei den Anzuchten – zumindest im Gewächshaus – meist bereits in der geschlossenen Blüte auf der Narbe beobachtet werden konnte. Dieser Umstand kann bei Kleistogamen (selbstbestäubenden Pflanzen) wiederholt beobachtet werden und wurde auch für *Lepidium*-Arten beschrieben (THELLUNG 1906). Überdies sind die Blüten von *L. campestre* duftlos, was auf die nicht vorhandene Notwendigkeit des Anlockens von Bestäubern zurückzuführen ist. Dagegen ist *L. appelianum* selbst-inkompatibel (FRANCIS & WARWICK 2008), die wohlriechenden Blüten werden meist von Insekten bestäubt, die den von den Pflanzen bereitgestellten Nektar als Nahrungsquelle verwenden (MULLIGAN & FINDLAY 1974).

Durch den verlängerten Griffel werden die Narben vor der Blütenöffnung nicht mit eigenem Pollen belegt, sondern vielmehr durch die noch geschlossenen Blüten nach oben geschoben (vgl. **Abb. 2.1**, Stage 11-12), wodurch zum einen die Fremdbestäubung gefördert, aber auch die Selbstbestäubung erschwert wird.

Zusätzlich scheint auch bei *L. appelianum* eine Reproduktionsbarriere zu existieren, so dass artfremder Pollen nicht auf Narben von *L. appelianum* keimen kann. Auf molekularer Ebene wird, möglicherweise auf dem für Brassicaceen üblichen sporophytischen Selbstinkompatibilitätssystem beruhend (BATEMAN 1955; NASRALLAH 2000; KACHROO *et al.* 2002; FOBIS-LOISY *et al.* 2004), der artfremde Pollen an der Exine erkannt. Letztlich wird die Ausbildung von Pollenschläuchen verhindert (vgl. **Abb. 3.16**), so dass es nicht zu einer Befruchtung kommen kann. Die Blüten der autogamen Art *L. campestre* (MULLIGAN 2002) besitzen allem Anschein nach ein solches Selbstinkompatibilitätssystem nicht, so dass die Pollen von *L. appelianum* zumindest in den Griffel *L. campestre* auswachsen können (s. **Abb. 3.16**). Fertile Samen werden hierbei jedoch wahrscheinlich nicht produziert. So scheint es trotz der teilweise überlappenden Verbreitungsareale dieser beiden *Lepidium*-Taxa – zumindest in Nordamerika (MULLIGAN 2002) – nicht zu Hybridisierungsereignissen zwischen den zwei untersuchten *Lepidium*-Arten zu kommen.

## 4.2 Charakterisierung von Fruchtentwicklungsgenen der untersuchten *Lepidium*-Arten

### 4.2.1 Single-copy- oder multi-copy-Gene?

Die Ergebnisse der Southern Analysen deuten darauf hin, dass es sich bei den meisten der untersuchten Fruchtentwicklungsgene aus *L. campestre*, *L. appelianum* und *Ae. carneum* um single-copy-Gene handelt (vgl. **3.4**). So konnte für die Gene *LaALC*, *LaFUL*, *LaSHP1*, *LaSHP2*, und *LaRPL* sowie *LcALC*, *LcIND*, *LcSHP2*, *LcFUL* und *LcRPL* sowie das Gen *AecSHP2* jeweils eine Bande detektiert werden. Bei diesen Genen handelt es sich wahrscheinlich um single-copy-Gene. Die zwei für *LaIND* nachgewiesenen Banden könnten dagegen auf eine zweite Gen-Kopie von *IND* in *L. appelianum* hindeuten, aber auch als Signale eines paralogen Gens gedeutet werden. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *AtIND* mit den paralogen Genen *HECATE2* (AT3G50330) und *HECATE3* (AT6G09750) (BUCK & ATCHLEY 2003) könnte eines dieser Paralogen in *L. appelianum* nachgewiesen worden sein. Das Vorhandensein

zweier *IND*-Gene in einem Taxon ist zwar aus *Brassica napus* bekannt, allerdings handelt es sich hierbei um eine allotetraploide Art, und auch beide diploiden Elternarten von *B. napus* (*B. rapa* und *B. oleracea*) besitzen nur je ein *IND*-Gen (GIRIN *et al.* 2010), so dass die Existenz einer zweiten *IND*-Kopie für *L. appelianum* eher unwahrscheinlich ist. Dass wiederum nicht in allen Laufspuren bei *LaIND* zwei Banden detektierbar sind kann daran liegen, dass *LaIND* und ein mutmaßlich paraloges Gen nach Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen in Restriktionsfragmenten gleicher Größe vorliegen. Diese könnten dann im Agarosegel nicht voneinander getrennt werden. Weiterhin ergaben Southern Analysen für das Gen *LcSHP1* zwei Banden (Restriktion mit *EcoRV*, vgl. **Abb. 3.8**). Die größere Bande entspricht jedoch derjenigen Bande, die für *LcSHP2* detektiert wurde, was auf Kreuzhybridisierung für *LcSHP1* schließen lässt und auch bei *LcSHP1* davon ausgegangen werden kann, dass es sich um ein single-copy Gen handelt.

#### 4.2.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen der analysierten Fruchtentwicklungsgene mit *A. thaliana*

Die isolierten Fruchtentwicklungsgene aus *L. appelianum*, *L. campestre* und selbst aus *Ae. carneum* weisen hohe Sequenzähnlichkeiten verglichen mit Fruchtentwicklungsgenen aus *A. thaliana* auf, insbesondere auf Aminosäureebene sind die Ähnlichkeiten sehr hoch (vgl. **Abb. 3.3**).

#### MADS-Box Gene *SHP1*, *SHP2* und *FUL*

Die *SHP1* Gene zeigen insgesamt 16 Aminosäure-Substitutionen, von denen zwei ausschließlich bei *L. appelianum* auftretende Aminosäure-Substitutionen im Vergleich zu *AtSHP1* sind (Pfeile in **Abb. 3.3 a**). Bei der ersten dieser zwei betreffenden Aminosäure-Substitutionen wurde die unpolare, hydrophobe Aminosäure (AS) Valin gegen das strukturell ähnliche Leucin (LÖFFLER *et al.* 2006) ausgetauscht. Bei der zweiten AS-Mutation, einer Insertion bei beiden *Lepidium*-Arten, besitzt *L. campestre* ein Valin; bei *L. appelianum* ist hier wiederum das strukturell ähnliche Leucin vorhanden. Aufgrund der biologischen Ähnlichkeit der ausgetauschten bzw. eingefügten Aminosäuren ist es unwahrscheinlich, dass Änderungen in diesem Gen an der Entwicklung von Schließfrüchten beteiligt sind, zumal *SHP1* und *SHP2* redundant sind; bei *Arabidopsis*-Mutanten müssen Genprodukte beider *SHP*-Gene fehlen, damit diese einen Schließfrucht-Phänotypen

zeigen (LILJEGREN *et al.* 2000). Die übrigen AS-Substitutionen in *SHP1* sind in beiden *Lepidium*-Arten identisch und kommen daher als potentielle Verursacher von Indehiszenz nicht in Frage.

Im **SHP2**-Alignment sind die meisten Änderungen zwischen *A. thaliana* und *Ae. carneum* zu finden; ein Großteil dieser Substitutionen in *Ae. carneum* ist jedoch auf die relativ variable C-Domäne beschränkt (vgl. Abb. 3.3 b) (HONMA & GOTO 2001; KAUFMANN *et al.* 2005). Fünf AS-Substitutionen sind hingegen ausschließlich bei **LaSHP2** zu finden, wiederum verglichen mit dem *Arabidopsis thaliana* SHP2-Gen. Diese Austausche betreffen wiederum zumeist strukturell ähnliche Aminosäuren, (Insertion von Valin und Lysin; Tyrosin → Phenylalanin; Asparagin → Asparaginsäure; Prolin → Alanin). Die als Helixbrecher bekannte Aminosäure Prolin (CHOU & FASMAN 1974; PTITSYN & FINKELSTEIN 1983) wird in *L. appelianum* durch Alanin ersetzt, was jedoch aufgrund des Auftretens kurz vor dem C-Terminus ohne Folgen bleiben dürfte (Substitution fünf AS vor dem Ende des Proteins). Die übrigen Substitutionen – verglichen mit Sequenzen vom *Arabidopsis thaliana* Wildtyp – sind wiederum in den beiden *Lepidium*-Arten gleich. Demnach dürfte *SHP2* aus demselben Grund wie *SHP1* als verantwortliches Gen für die Evolution von Schließfrüchten in *L. appelianum* nicht in Frage kommen.

In **FUL**, dem dritten MADS-Box Gen, sind wiederum nur zwei Austausche zu finden, die so nur in *L. appelianum* auftreten (vgl. Abb. 3.3 c). Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften dieser Aminosäuren (Serin → Asparagin, polar, neutral; Phenylalanin → Leucin, unpolar, hydrophob) sind diese Substitutionen wahrscheinlich nicht für Indehiszenz in *L. appelianum* verantwortlich.

### **BELL-Homöodomänen-Gen RPL**

Von den 58 in **RPL** gefundenen Aminosäure-Substitutionen (vgl. Abb. 3.3 d) zwischen *L. campestre*, *L. appelianum* und *A. thaliana* sind 8 AS-Änderungen einzig bei *L. appelianum* zu finden. Hier kommt es, anders als bei den AS-Substitutionen der MADS-Box Gene, auch zum Austausch strukturell unterschiedlicher Aminosäuren, wie etwa dem Austausch von Histidin (basisch) zu Glutamin (neutral), Glycin (neutral) zu Valin (hydrophob) oder Serin (neutral) zu Threonin (hydrophob). Daneben könnte die biologische Struktur durch wiederholt auftretende Insertionen und Deletionen zu einem funktional veränderten Protein geführt haben. Sollte diese Proteinstrukturänderung den Phänotypen (Indehiszenz in *L. appelianum*)

beeinflussen, so könnte *RPL* auf einem indirekten Regulationsweg *SHP1* und *SHP2* negativ regulieren.

### **Mögliche regulatorische Konsequenz eines veränderten REPLUMLESS**

Es ist bekannt, dass in *Arabidopsis* *rpl* Knockout-Mutanten kein Replum ausgebildet wird, da diese Mutanten *SHP* ektopisch im Replum exprimieren (s. **Abb. 1.2**). Allerdings kann das Replum wiederhergestellt werden, wenn zusätzlich die *SHP*-Gene (z.B. in *rpl shp1,2* Tripel-Mutanten) und damit die Dehiszenzzonen-Identitätsgene entfernt werden (ROEDER *et al.* 2003; ROEDER & YANOFSKY 2006). *SHP*-Genprodukte können nun aber auch indirekt entfernt werden, indem die upstream-Regulatoren von *SHP1* und *SHP2* ausgeschaltet werden. So führt der Knockout der redundanten Gene *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, *YABBY3 (YAB3)* und *JAGGED (JAG)* dazu, dass **(I)** die Menge an *SHP*-Genprodukten deutlich herabgesetzt ist (eine *FUL*-Expression in den Fruchtklappen fehlt gänzlich) und **(II)** dazu, dass ein weitgehend normal gestaltetes Replum ausgebildet wird (DINNENY *et al.* 2005). Zum Entfernen der *SHP*-Expression ist sogar *JAG* ausreichend, wie anhand einer *rpl jag-5d*-Doppelmutante gezeigt werden konnte; diese Mutanten bildeten jedoch ein intaktes Replum aus. Das wiederum führt zu der Annahme, dass *JAG* als Aktivator für *SHP* dient. Schließlich wirkt *RPL* nur indirekt als Repressor auf die *SHP*-Gene, indem es die Expression von *JAG* im Replum hemmt (DINNENY *et al.* 2005; LEWIS *et al.* 2006). Dies impliziert schließlich, dass *RPL* zwar bei der Begrenzung der Dehiszenzzone beteiligt ist und hierfür zwingend benötigt wird, für die eigentliche Entwicklung des Replums ist *RPL* jedoch nicht nötig (DINNENY *et al.* 2005). Ein verändertes oder nicht mehr funktionierendes REPLUMLESS könnte möglicherweise als Repressor von *JAG* nicht mehr zur Verfügung stehen, was indirekt die fehlende Aktivierung der *SHP*-Gene erklären könnte. Auf diesem Weg könnte *RPL* für die Evolution von Schließfrüchten in *Lepidium appelianum* verantwortlich sein, dieses Szenario würde gleichzeitig auch das Vorhandensein des Replums erklären (s.o.).

### **Ortholog versus paralog**

Aminosäure-Substitutionen innerhalb der MADS-Box Gene (*SHP1*, *SHP2*, *FUL*) scheinen keine Änderung der biologischen Eigenschaften der exprimierten Proteine mit sich zu führen, zumindest nicht für die Fruchtentwicklungsgene aus *L. campestre*

mit seinen Öffnungsfrüchten. Nur aufgrund der Ähnlichkeiten auf Aminosäureebene sollte jedoch nicht auf die Orthologie dieser Kandidatengene zu *Arabidopsis*-Fruchtentwicklungsgenen geschlossen werden. Eine oberflächliche Betrachtung auf der Basis von Aminosäure-Ähnlichkeiten kann vielmehr zu Fehlinterpretationen bezüglich der Orthologie führen, da zwischen orthologen und paralogen Genen aufgrund ihres phylogenetischen Ursprungs unterschieden werden muss (FITCH 1970). Aufgrund der Tatsache, dass orthologe Gene durch Speziation entstehen, behalten diese in der neuen Spezies zumeist die Funktion des Vorläufers. Paraloge entstehen hingegen durch Genduplikation innerhalb einer Art und besitzen zunächst redundante Funktionen, ein Zustand, der jedoch häufig nicht sehr lange anhält. Im Laufe der Evolution entwickeln Paraloge vielmehr unterschiedliche Funktionen aus, oder aber alle bis auf ein paraloges Gen (wobei dieses verbleibende nicht das ursprüngliche Gen sein muss) verschwinden aus dem Genom (THEISSEN 2002). Der Nachweis für Orthologie zweier Gene ist daher nur mittels phylogenetischer Analysen und vergleichender Funktionsstudien (Transformationsexperimente) zu erbringen.

### 4.3 Phylogenetische Analysen der Fruchtentwicklungsgene

Aufgrund der Ergebnisse der Bayesischen Analysen gibt es starke Evidenzen dafür, dass es sich bei allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Kandidatengene *FUL*, *SHP1*, *SHP2* sowie *RPL* aus *Lepidium campestre* und *L. appelianum* sowie bei *SHP2* von *Ae. carneum* um Orthologe der Fruchtentwicklungsgene aus *Arabidopsis thaliana* handelt. Die phylogenetische Stellung der untersuchten Gene im Schwestergruppenverhältnis zu den Fruchtentwicklungsgenen aus *A. thaliana* sowie weiteren putativ orthologen Brassicaceen-Gene (vgl. **Abb. 3.6** und **3.7**) kann als eindeutiges Indiz hierfür angesehen werden.

Als gesichert kann angenommen werden, dass die paralogen Gene *SHP1* und *SHP2* (MOORE *et al.* 2005) sowohl in *L. campestre* als auch in *L. appelianum* vorhanden sind. Aufgrund der Annahme, dass Paraloge in der Regel zunächst redundante Funktionen besitzen und im Laufe der Zeit neue Aufgaben hinzugewinnen, kann zusätzlich angenommen werden, dass die *SHP*-Duplikation der Brassicaceen rezent ist. Trotz der noch immer vorhandenen funktionalen Redundanz von *SHP1* und *SHP2* (Ausbildung der DZ (LILJEGREN *et al.* 2000); Entwicklung von Samenanlagen

(PINYOPICH *et al.* 2003); Ausbildung von Stigma und Stylus (COLOMBO *et al.* 2010)) können auch voneinander abweichende Funktionen der zwei *SHP*-Gene diskutiert werden. So wird beispielsweise allein eine hohe Expression von *SHP2* in keimenden *Arabidopsis*-Samen gezeigt (BARRERO *et al.* 2010), was jedoch bislang nicht durch weitere Studien bestätigt werden konnte.

Es gibt überdies auch funktional redundante Gene, die phylogenetisch weiter voneinander entfernt sind, wie z.B. Gene der monophyletischen *AGAMOUS*-Klade. So sind an der Ausbildung der Samenanlagen sowie von Stigma und Stylus einerseits die *SHP*-Gene beteiligt, andererseits aber auch das redundante paraloge Gen *SEEDSTICK* (PINYOPICH *et al.* 2003; COLOMBO *et al.* 2010).

Die Ergebnisse aller Phylogenie-Ansätze (NJ, MrBayes, Bootstrap) zeigen, dass es sich bei den isolierten Genen aus *L. campestre*, *L. appelianum* und *Ae. carneum* wahrscheinlich um Orthologe zu Fruchtentwicklungsgenen aus *Arabidopsis thaliana* handelt. Nun ist hierbei offensichtlich die Methode, mit der ein Stammbaum bestimmt wird, nicht entscheidend. Bereits beim NJ-Ansatz, der die verschiedenen Nukleotid-Substitutionen gleich stark gewichtet (JUKES & CANTOR 1969) wird dies deutlich, besonders im Vergleich mit der Bayesischen Analyse. Trotz der Bestimmung des wahrscheinlichsten Substitutionsmodells mittels „most likelihood“-Ansätzen ändert sich die Phylogenie nur geringfügig, die relevanten Hauptgruppen bzw. Unterfamilien werden in den unterschiedlichen Ansätzen erkannt (vgl. **Abb. 3.4** – **Abb. 3.7**).

Die Duplikation der *SHP*-Gene in *Arabidopsis* wird mit einer Genomduplikation (Whole Genome Duplication; WGD) in den Brassicaceen in Verbindung gebracht (CAUSIER *et al.* 2005). Diese Genomduplikation teilen allem Anschein nach alle Brassicaceen mit Ausnahme der Gattung *Aethionema* (FRANZKE *et al.* 2011).

Dies deckt sich mit dem Nachweis von nur einem *adc*-Gen in *Aethionema*, aber zweien in allen anderen untersuchten Brassicaceen-Arten (GALLOWAY *et al.* 1998). Der Zeitpunkt dieser Genomduplikation (*At*- $\alpha$ WGD) wird sehr unterschiedlich diskutiert. Folgt man der Einschätzung von BOWERS *et al.* (2003), so fand die entsprechende Duplikation vor etwa 86 Millionen Jahren statt, diese Zeitspanne wurde aber in den letzten Jahren immer wieder herabgesetzt. Wird in älteren Arbeiten noch ein Alter von 24-60 Millionen Jahre für den Split von *Aethionema* und den

restlichen Brassicaceen angegeben (KOCH *et al.* 2000; KOCH *et al.* 2001; ERMOLAEVA *et al.* 2003; HENRY *et al.* 2006; SCHRANZ & MITCHELL-OLDS 2006; FAWCETT *et al.* 2009), so gehen FRANZKE *et al.* (2009) mit einem ungefähren Alter von etwa 15 Millionen Jahren (1-35 Millionen Jahre) von einem sehr viel geringeren Alter für die Brassicaceen aus. Neuesten Untersuchungen zufolge und auf neuen Fossilienfunden beruhend, wird das Alter der Brassicaceen mit etwa 54,3 Millionen angegeben (BEILSTEIN *et al.* 2010).

Diese Altersabschätzung ist allerdings umstritten, da das verwendete Fossil nicht zweifelsfrei identifiziert ist (FRANZKE *et al.* (2011); Kommentar K. MUMMENHOFF, <http://www.nature.com/nature/journal/v467/n7317/full/467755d.html>).

Das Einbeziehen von Fruchtentwicklungsgenen aus *Aethionema carneum* mit seinen heterokarpen Früchten in die Phylogenie lieferte interessante Hinweise, mit denen die Aussagen von GALLOWAY *et al.* (1998) unterstützt werden können. GALLOWAY *et al.* (1998) vermuten anhand ihrer Untersuchungen der Arginin-Decarboxylase (*adc*), dass sich eine Genduplikation innerhalb der Brassicaceae auf die Core Brassicaceae beschränkt hat und dass die Gattung *Aethionema* diese Genomduplikation nicht erlebt hat, die Duplikation also nach der Trennung der Core Brassicaceae und der Aethionemeae stattgefunden haben muss. Als Hinweis hierfür diente der Nachweis von zwei (paralogen) *adc*-Kopien in allen Brassicaceen, während in der Gattung *Aethionema* lediglich eine Genkopie von *adc* nachgewiesen werden konnte.

Ähnlich gestalten sich die Ergebnisse bei den Brassicaceen für die *SHATTERPROOF*-Gene. So konnte nur ein *SHP*-Gen in *Aethionema carneum* isoliert werden (*SHP2*), wohingegen für verschiedene andere Brassicaceen-Arten jeweils zwei *SHP*-Gene bekannt sind (s. MADS-Box Gen-Phylogenie, **Abb. 3.6**). Allerdings bedarf es hier weiterer Untersuchungen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass das zweite *SHP*-Gen existiert und aufgrund methodischer Probleme bislang nicht isoliert werden konnte. Dagegen spricht allerdings, dass bei Southern Hybridisierungen in *Lepidium campestre* Kreuzhybridisierung mit dem zweiten *SHP*-Gen zu sehen ist, ein Umstand, der bei *Aethionema carneum* nicht beobachtet wurde (vgl. **Abb. 3.8**).

#### 4.4 Evolution der genetischen Regulation der Fruchttöffnung in *Lepidium*

Die mittels *in situ* Hybridisierung erhobenen Expressionsdaten aus *Lepidium* lassen sich zum Teil mit der aus *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen bekannten genetischen Regulation vergleichen (Expressionsergebnisse für *L. campestre*), ein zweiter Teil der *in situ*-Ergebnisse ist mit dem *Arabidopsis* Mutanten-System vergleichbar (Expressionsergebnisse für *L. appelianum*). Zunächst sei an dieser Stelle die mögliche Regulation der Fruchttöffnung in *L. campestre* diskutiert, die große Ähnlichkeiten zu der aus *Arabidopsis* bekannten Regulation aufzuweisen scheint.

##### *Lepidium campestre* - Öffnungsfrüchte

Die Expression aller untersuchten Fruchtentwicklungsgene zeigt bei der durch Öffnungsfrüchte charakterisierten Art *L. campestre* große Ähnlichkeiten zur genetischen Regulation der Fruchttöffnung aus *Arabidopsis*. Eine Expression der Dehiszenzzonen-Identitätsgene *SHP1,2* (FLANAGAN *et al.* 1996; FERRANDIZ *et al.* 2000; LILJEGREN *et al.* 2000) sowie der von den *SHP*-Genen regulierten bHLH-Gene *ALC* und *IND* (RAJANI & SUNDARESAN 2001; LILJEGREN *et al.* 2004) konnte im Dehiszenzzonenbereich von *L. campestre*-Früchten nachgewiesen werden (**Abb. 3.9 - 3.12**). Auch der Vergleich des die *SHP*-Gene hemmenden Gens *FUL* (FERRANDIZ *et al.* 2000) zeigt keine großen Expression-Unterschiede; sowohl in *Arabidopsis* Wildtyp-Früchten als auch in *L. campestre* Früchten (**Abb. 3.13**) ist – auch in den unterschiedlichen Fruchtentwicklungsstadien – eine *FUL*-Expression deutlich erkennbar (MANDEL & YANOFSKY 1995; GU *et al.* 1998; FERRANDIZ *et al.* 2000). Problematisch gestaltete sich der Expressionsnachweis von *RPL*, was jedoch auch in *Arabidopsis* größere Schwierigkeiten zu bereiten schien (CRISTINA FERRANDIZ, pers. Mitteilung). Der Expressionsnachweis von *RPL* in *Arabidopsis* erfolgte daher mit Hilfe einer *RPL::RPL-GUS*-Reporter-gen-Mutante (ROEDER *et al.* 2003; ALONSO-CANTABRANA *et al.* 2007).

Die Expression von *RPL* in *L. campestre* konnte schließlich im Infloreszenzmeristem nachgewiesen werden (**Abb. 3.14**). Die Genaktivität von *LcRPL* ist ähnlich lokalisiert, wie die für *PENNYWISE* (Synonym zu *RPL*) nachgewiesene Expression in *Arabidopsis* Wildtyp-Infloreszenzen (ROEDER & YANOFSKY 2006). Allerdings ist sie bei *L. campestre* etwas weniger stark ausgeprägt als bei *Arabidopsis* (SMITH & HAKE 2003; COLE *et al.* 2006).

### ***Lepidium appelianum* - Schließfrüchte**

Eine Betrachtung der Fruchtentwicklungsgene in *L. appelianum* zeigt zum Teil ein anderes Bild als dies für *L. campestre* beschrieben wurde. So sind in Fruchtquerschnitten von *L. appelianum* keine Expressionssignale der Dehiszenzzonen-Identitätsgene (*SHPI*, *SHP2*, *ALC*, *IND*) nachweisbar. Die upstream-Regulatoren *FUL* und *RPL* sind in *L. appelianum* hingegen ebenso wie in *L. campestre* nachweisbar (vgl. **Abb. 3.9 – 3.14**). Die in Kapitel **3.5.1** dargestellten Unterschiede in der Expression der Fruchtklappenrand-Identitätsgene zwischen *L. campestre* und *L. appelianum* werden im Folgenden erörtert.

### **Expressionsmuster der Fruchtentwicklungsgene – *L. campestre* vs. *L. appelianum***

Die Expression von *FUL* ist bei *L. appelianum* vergleichbar mit der von *L. campestre* (**Abb. 3.13**) und *Arabidopsis* Wildtyp-Früchten (MANDEL & YANOFSKY 1995; GU *et al.* 1998; FERRANDIZ *et al.* 2000). Auch ist bei *RPL* kein gravierender Unterschied erkennbar, wenngleich die Expression in der Infloreszenz von *L. appelianum* etwas schwächer zu sein scheint als bei *L. campestre*. Erstaunlich ist, dass *in situ* Hybridisierungsexperimente mit *RPL* in Fruchtquerschnitten aller Ontogeniestadien fehlgeschlagen sind, denn Northern Expressionsstudien zeigen eine schwache *RPL*-Expression in *L. appelianum*-Blüten des Entwicklungsstadiums 13, bei *L. campestre* ist eine *RPL*-Expression in Entwicklungsstadium 15 erkennbar (vgl. **Abb. 3.15**). Diese temporalen Expressions-Unterschiede könnten jedoch auch durch methodische Ursachen bedingt sein, wie beispielsweise die visuelle Beurteilung der Frucht- bzw. Blütenstadien. Hingegen erklären sie nicht, dass *in situ* Hybridisierungsversuche in Fruchtquerschnitten gänzlich misslingen. Auffällig und kontrovers zu diskutieren sind hingegen die Unterschiede, die für die Dehiszenzzonen-Identitätsgene zwischen den *Lepidium*-Arten und auch im Vergleich mit *Arabidopsis* aufgelöst werden konnten.

### **SHATTERPROOF-Gene**

Folgt man der Regulationskaskade der Fruchtöffnung von *Arabidopsis* Wildtyp-Früchten (DINNENY & YANOFSKY 2005), so werden die *SHP*-Gene in der DZ exprimiert. Die Expression von *SHPI* und *SHP2* im Dehiszenzzonen-Bereich von *L. appelianum*-Früchten ist jedoch nicht nachweisbar. Durch das Ausbleiben dieser Genprodukte wird die für *Arabidopsis* postulierte Regulationskaskade an diesem

Punkt gestoppt. Eine Aktivierung von *ALC* und *IND* durch *SHATTERPROOF1* und *SHATTERPROOF2*, wie für *Arabidopsis* Wildtyp-Früchten beschrieben (RAJANI & SUNDARESAN 2001; LILJEGREN *et al.* 2004) und auch für *L. campestre* angenommen werden kann (s.o.), erfolgt demnach in den Schließfrüchten von *L. appelianum* offenbar nicht. Von beiden Genen wurde keine Expression im Dehiszenzzonen-Bereich von *L. appelianum* nachgewiesen (vgl. **Abb. 3.11, 3.12**). Dies führt in *L. appelianum* anscheinend dazu, dass die Früchte sich nicht öffnen können, weil die durch *ALC* gesteuerte Ausbildung der Trennschicht sowie die Ausbildung von verholzten Fruchtklappenrandzellen – in Öffnungsfrüchten von *Arabidopsis* durch *SHP1*, *SHP2* und *IND* reguliert – unterbleibt (LILJEGREN *et al.* 2000; LILJEGREN *et al.* 2004).

Dass der Verlust von Dehiszenz durch die fehlende Ausbildung einer Trennschicht erfolgen kann, wird bereits von ZOHARY (1948) für verschiedene Brassicaceen-Arten beschrieben. Es ist also wahrscheinlich, dass die fehlende Expression von *ALC* und *IND* im Dehiszenzzonen-Bereich ein downstream-Effekt ist, hervorgerufen durch upstream-Regulatoren von *SHP*. Natürlich können auch die *SHATTERPROOF*-Gene selbst als Verursacher von Indehiszenz in *L. appelianum* in Frage kommen (vgl. **1.4**), allerdings müssten in diesem Fall Mutationen in beiden *SHP* Genen bzw. regulatorischen Bereichen dieser Gene in *L. appelianum* vorliegen; Mutationen in nur einem dieser paralogen, funktional redundanten Gene dürften für die Entwicklung von Schließfrüchten in *L. appelianum* nicht ausreichen, da zumindest in *A. thaliana* diese Gene redundant sind und jeweils die Funktion des anderen Gens übernehmen können (LILJEGREN *et al.* 2000; MOORE *et al.* 2005). Daher sind genetische Änderungen in den *SHP*-Genen und deren Beteiligung an der Entwicklung von Indehiszenz in *L. appelianum* als eher unwahrscheinlich zu erachten.

Dementsprechend stellt sich die Frage, welche an der Fruchtentwicklung beteiligten Gene in *L. appelianum* Veränderungen im Vergleich zu Öffnungsfrüchten zeigen und damit zu indehiszenten Früchten geführt haben könnten. Bei der Betrachtung von Genotypen verschiedener *Arabidopsis*-Mutanten-Phänotypen (indehiszente Früchte), die in der Natur nicht beschrieben wurden, wird deutlich, dass Schließfrüchte sowohl durch loss-of-function- als auch durch gain-of-function-Mutationen hervorgerufen werden können. Aufgrund der Expressionsergebnisse ist die wahrscheinlichste Erklärung für die Evolution von Schließfrüchten in *L. appelianum* in den Ursachen einer abgeänderten *SHP*-Regulation im Dehiszenzzonen-Bereich zu finden

(upstream-Regulation). Der Expressionsnachweis der *SHP*-Gene in *L. appelianum* konnte prinzipiell erbracht werden, eine Expression dieser Gene konnte in den Samenanlagen belegt werden (s. **Abb. 3.8, 3.9**). Eine Expression beider *SHP*-Gene ist auch für *Arabidopsis* in den Samenanlagen beschrieben (MA *et al.* 1991; SAVIDGE *et al.* 1995; FLANAGAN *et al.* 1996). Somit ist davon auszugehen, dass eine raumzeitliche Änderung der Expression dieser Gene stattgefunden hat.

In *Arabidopsis* ist, sofern nicht *SHP1* und *SHP2* gleichzeitig direkt ausgeschaltet werden (*shp1,2* Doppelmutante), ein indirektes Ausschalten der *SHP*-Gene durch verschiedene upstream-Regulatoren möglich und für *Arabidopsis* mehrfach beschrieben. So weisen *35S::FUL* Mutanten eine ektopische Expression von *FUL* in der gesamten Fruchtklappe auf, was aufgrund der fehlenden Ausbildung der Dehiszenzzone mitsamt der Trennschicht die Ausbildung indehiszenter Früchte zur Folge hat (FERRANDIZ *et al.* 2000). In den Dehiszenzonen-Bereichen solcher *Arabidopsis*-Mutanten-Früchte ist weder *SHP1*- noch *SHP2*-Expression nachweisbar. Dieses System wurde bei *Brassica juncea* erfolgreich auf Nutzpflanzen übertragen (OSTERGAARD *et al.* 2006), um Ernteverluste zu minimieren (vgl. **4.6**).

### **REPLUMLESS**

Auf eine eher indirekte Weise kann auch *RPL* die Expression der *SHP*-Gene hemmen, indem es die Expression von *JAG*, *FIL* und *YAB3* im Replum unterdrückt. Diese drei Gene aktivieren redundant den upstream-Regulator der *SHP*-Gene, *FUL*, in den Fruchtklappen sowie die *SHP*-Gene selbst am Fruchtklappenrand (DINNENY *et al.* 2005). Durch Unterdrücken der *SHP*-Aktivität durch *RPL* im Replum und durch *FUL* in den Fruchtklappen bilden die Pflanzen also eine Dehiszenzzone am Fruchtklappenrand sowie ein korrektes Replum aus (vgl. **Abb. 1.3 a, b**). Unterbleibt jedoch die Produktion von RPL, z.B. in *rpl*-Mutanten, so kommt es zur ektopischen Bildung von Fruchtklappenrandzellen im Bereich des Replums, da die *SHP*-Gene nun ektopisch im Replum exprimiert werden (ROEDER *et al.* 2003); ein typisch ausgebildetes Replum entwickelt sich nicht. Wird jedoch zusätzlich die *SHP*-Aktivität entfernt (in *rpl shp1,2* Tripelmutanten), so bilden die Pflanzen wiederum ein Replum aus (ROEDER *et al.* 2003). Genau solch einem Phänotypen entspricht die *L. appelianum*-Schließfrucht: das Replum wird ausgebildet, die Entwicklung einer Dehiszenzzone ist jedoch unterbunden (vgl. **Abb. 1.3 c**). Einen ähnlichen Phänotyp zeigt auch die *Arabidopsis rpl jag* Doppelmutante. Diese Mutanten-Früchte

(Öffnungsfrüchte) bilden ein Replum aus und liefern gleichzeitig einen Hinweis darauf, dass *JAG* allein in der Lage ist, die Expression der *SHP*-Gene im Replum zu regulieren (DINNENY *et al.* 2005; LEWIS *et al.* 2006).

Sollten regulatorische Änderungen an *RPL* für die Evolution von Schließfrüchten in *L. appelianum* verantwortlich sein, dann müssen auch upstream-regulatorische Elemente von *RPL* berücksichtigt und gegebenenfalls analysiert werden, um deren Beteiligung an der Expressionsänderung von *RPL* auszuschließen oder zu bestätigen.

### **Beteiligung von BELL- und KNOX-Genen an Indehiszenz in *L. appelianum*?**

BELL- und KNOX-Proteine bilden Heterodimere aus, die für die Infloreszenz-entwicklung von wesentlicher Bedeutung sind (KANRAR *et al.* 2006). So bildet REPLUMLESS (Vertreter der BELL Familie) mit verschiedenen KNOX-Proteinen wie BREVIPEDICELLUS (BP), SHOOTMERISTEMLESS (STM) und KNAT6 (K6) Heterodimere aus, die durch spezifische Bindung an Target-Sequenzen die Meristemfunktion steuern (BELLAOUI *et al.* 2001; BYRNE *et al.* 2003; SMITH & HAKE 2003; BHATT *et al.* 2004; ALONSO-CANTABRANA *et al.* 2007). Die Redundanz dieser drei Klasse I KNOX-Gene (BYRNE *et al.* 2003) schließt zunächst alle Gene als potentielle Regulatorgene für *RPL* im Replum ein. Die Expression der Gene *BP* und *K6* wird im *Arabidopsis* Wildtyp durch die funktional redundanten Gene *ASYMMETRIC LEAVES1,2* (*AS1*, *AS2*) gehemmt. Diese Gene (*AS1*, *AS2*) sind wiederum in den Fruchtklappen stärker exprimiert als im Replum, so dass die *BP*-Expression hauptsächlich auf das Replum beschränkt bleibt (ALONSO-CANTABRANA *et al.* 2007). Die *BP*-Expression hingegen scheint dort zumindest teilweise für die Expression von *RPL* verantwortlich zu sein, da *35S::BP*-Mutanten nicht nur im Replum eine deutlich erhöhte *RPL*-Expression zeigen, sondern auch eine ausgeweitete Expression von *RPL* auf die Fruchtklappen (ALONSO-CANTABRANA *et al.* 2007). Dass *35S::RPL*-Mutanten in *Arabidopsis* nun wiederum keine vom *Arabidopsis* Wildtyp abweichende Fruchtentwicklung zeigen (MÜHLHAUSEN *et al.* 2011) könnte daran liegen, dass BP und RPL nur als Heterodimer funktional aktiv sind. In *35S::RPL*-Mutanten wäre demnach zwar überall ausreichend RPL-Produkt verfügbar, aber durch das Fehlen des BP-Proteins außerhalb des Replums würde eine Phänotypenänderung ausbleiben. Dies könnte experimentell untersucht werden, indem man *35S::RPL* und *35S::BP* Konstrukte herstellt, beide gemeinsam in *Arabidopsis* transformiert und die entstehenden Früchte auf Dehiszenz untersucht.

### **Beteiligung von *AGAMOUS* an Indehiszenz in *L. appelianum*?**

Es gibt ferner Hinweise darauf, dass *AGAMOUS* (*AG*), ein weiteres MADS-Box Gen, an der Aktivierung der Fruchtklappenrand-Identitätsgene beteiligt ist. So werden die *SHP*-Gene in *ag* loss-of-function-Mutanten nicht exprimiert, in Überexpressions-Mutanten hingegen sehr wohl (SAVIDGE *et al.* 1995; FERRANDIZ *et al.* 2000; FERRANDIZ 2002). Die Hauptfunktion von *AGAMOUS* ist allerdings die Regulierung der Entwicklung von Reproduktionsorganen, wo es als C-Klasse-Gen im dritten und vierten Wirtel exprimiert ist und für die Entwicklung der männlichen und weiblichen Reproduktionsorgane (Stamina, Karpelle) verantwortlich ist (YANOFSKY *et al.* 1990; THEISSEN & SAEDLER 1995; THEISSEN *et al.* 2000; THEISSEN & SAEDLER 2001). Das *AGAMOUS*-Gen besitzt ein 3 kb großes Intron, über das *AGAMOUS* einerseits aktiviert werden kann (*LFY*, *WUS* (BUSCH *et al.* 1999; LOHMANN *et al.* 2001)), auf der anderen Seite ist aber auch die Repression von *AGAMOUS* durch verschiedene Gene möglich (*SEU*, *LUG*, *AP2* (DREWS *et al.* 1991; LIU & MEYEROWITZ 1995; FRANKS *et al.* 2002)). Zusätzlich wird *AGAMOUS* durch *REPLUMLESS* negativ reguliert, jedoch nur in den äußeren zwei Wirteln (BAO *et al.* 2004); *AG* ist hier als C-Klasse Gen nicht exprimiert. Somit kann RPL also nicht nur *SHP* direkt negativ regulieren, sondern auch hemmend auf *AGAMOUS* einwirken, indem es im zweiten Intron von *AGAMOUS* an einer spezifischen DNA-Bindestelle bindet (BAO *et al.* 2004) und so über eine indirekte Regulation die *SHP*-Gene negativ reguliert. Obwohl einige der beschriebenen Regulationen im *Arabidopsis* Wildtyp auf das Sprossapikalmeristem (SAM) beschränkt sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Gene auch innerhalb der Frucht in ähnlicher Weise interagieren. Ein Unterdrücken von *AGAMOUS* durch RPL im Dehiszenzzonen-Bereich, z.B. durch eine kleinräumige Expressionserweiterung auf eben diesen DZ-Bereich, könnte etwa dazu führen, dass die *SHP*-Gene nicht mehr ordnungsgemäß exprimiert werden, was die Ausbildung von Schließfrüchten zur Folge hätte. Die großen Ähnlichkeiten der DNA-Erkennungssequenz für RPL innerhalb des betreffenden *AGAMOUS*-Introns in *Arabidopsis* und *Lepidium phlebopetalum* (72%) (HONG *et al.* 2003; BAO *et al.* 2004) lassen jedoch vermuten, dass diese Erkennungssequenzen für RPL auch in *L. appelianum* und *L. campestre* ähnlich konserviert sind. Aus diesem Grund ist der Entwicklungsschritt zu Schließfrüchten in *L. appelianum* wahrscheinlich durch eine andere als der oben beschriebenen möglichen genetischen Änderungen hervorgerufen worden.

Aufgrund der oben dargestellten komplexen Regulationen im Bereich des Replums kann eine Beteiligung von *RPL* an der Entwicklung von Schließfrüchten in *Lepidium appelianum* nicht zweifelsfrei geklärt werden. Eine Beteiligung von *RPL* lässt sich jedoch auch nicht ausschließen. Für eine Beteiligung von *RPL* an der Entwicklung von Indehiszenz in *L. appelianum* spricht die Beobachtung, dass eine Punktmutation im regulatorischen Bereich des *RPL*-Orthologen aus Reis „seed-shatter“ (das Abbrechen der reifen Diasporen) verhindern kann (KONISHI *et al.* 2006). Das Schema einer möglichen genetischen Regulation von Indehiszenz in *L. appelianum* unter Einbeziehung von Regulations- oder Expressionsänderungen von *RPL* ist in **Abb. 4.1** dargestellt (*RPL*-Hypothese). Demnach wird für eine Beteiligung von *REPLUMLESS* an der Evolution von Schließfrüchten in *L. appelianum* auch noch eine Expressionsänderung eines weiteren Gens benötigt, die *RPL*-Hypothese setzt eine zusätzlichen Expressionserweiterung von *BP* voraus.

### **Prädisposition als Voraussetzung für Indehiszenz in *L. appelianum*?**

*Arabidopsis 35S::RPL*-Mutanten mit ektoptischer *RPL*-Expression in der gesamten Frucht zeigen keine Phänotypenänderung im Vergleich zum Wildtypen (MÜHLHAUSEN *et al.* 2011). Eine Veränderung von Öffnungs- hin zu Schließfrüchten ist jedoch bei *L. appelianum* gegeben. Da das Vorhandensein von *BP* und *RPL* hinreichend für eine Phänotypenänderung ist (die Evolution von Schließfrüchten, z.B. in *L. appelianum*) müssten mindestens zwei Mutationsereignisse stattgefunden haben, um eine Regulationsänderung unter Beteiligung von *RPL* schlüssig zu erklären.

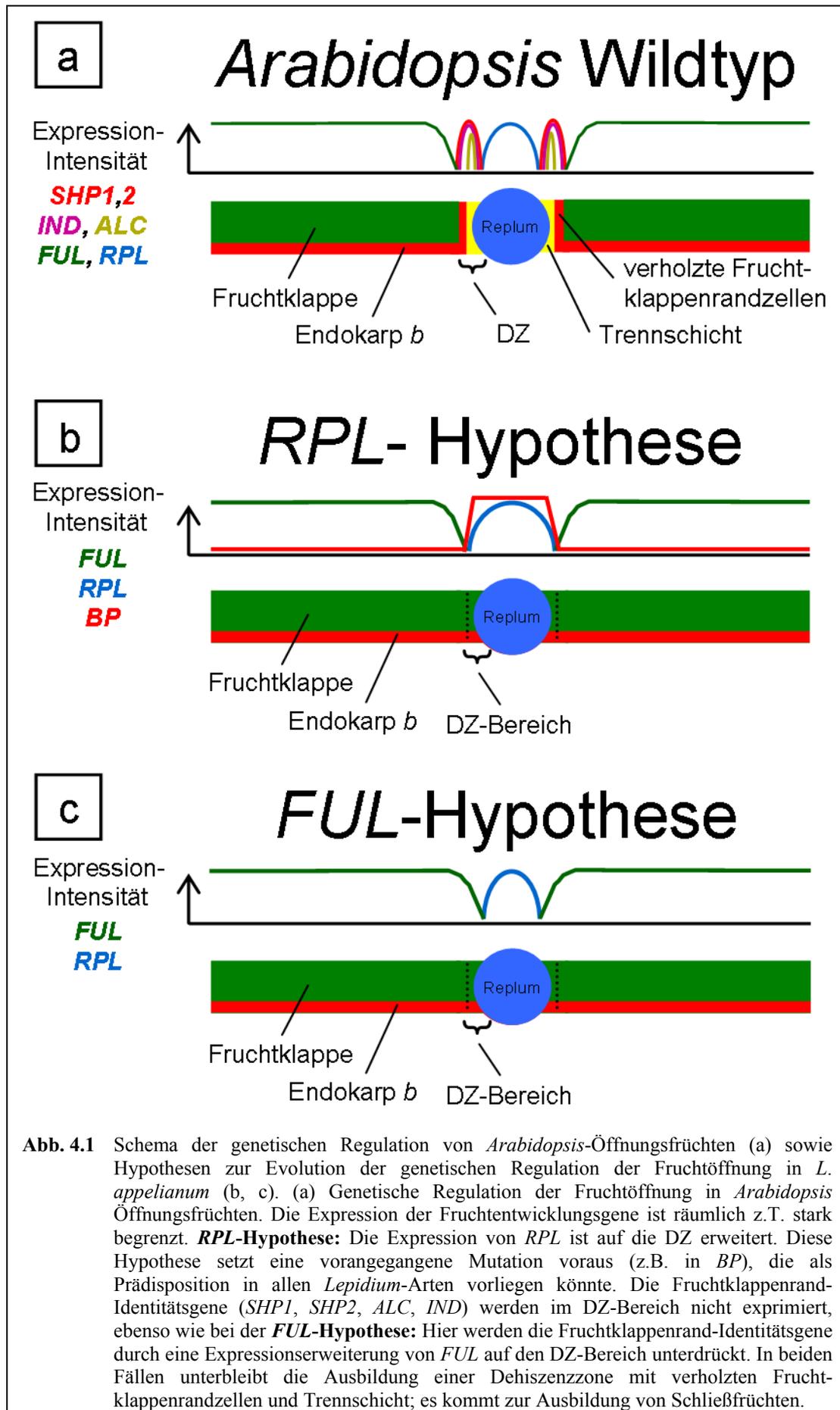
Man könnte annehmen, dass ein erstes solches Mutationsereignis im Verlauf der Evolution stattgefunden hat, zunächst jedoch keine weitreichenden Folgen mit sich gebracht hat, sondern vielmehr zu einer Prädisposition einer ganzen systematischen Einheit geführt haben könnte (ENDRESS 1992; BOWMAN *et al.* 1999). Setzt man eine solche Prädisposition für *Lepidium* (oder für die Familie der Brassicaceae) als gegeben voraus, so könnte dies einerseits die Entstehung von Schließfrüchten in *L. appelianum* erklären, andererseits aber auch ein Erklärungsansatz für die wiederholte Entstehung von Indehiszenz in der Gattung *Lepidium* bzw. in der ganzen Familie der Brassicaceen sein. Hinweise, dass eine Prädisposition für die Entwicklung von Indehiszenz in z.B. *Lepidium* vorliegt, könnten anhand mehrerer indehiszenter Arten aus *Lepidium* getestet werden. Hier würden sich zunächst die nah verwandten Arten aus der Linie *Lepia* (*L. draba* (L.) Desv. (2 Subspezies), *Stubendorffia orientalis*

Schrenk, *S. gracilis* (N.Pavl.) Botsch., *S. lipskyi* Busch) sowie Taxa mit indehiszenten Früchten aus *Lepidium* s.l. anbieten (*Stubendorffia aptera* Lipskyi) (MUMMENHOFF *et al.* 2001a; AL-SHEHBAZ *et al.* 2002; MUMMENHOFF *et al.* 2009).

### **FRUITFULL**

Eine weitere mögliche Erklärung für den Übergang zu Schließfrüchten bei *L. appelianum* ist eine Änderung in der Regulation bzw. eine räumliche Ausweitung der Expression von *FUL* in den Dehiszenzzonen-Bereich. Trotz der ähnlichen Expression in den Früchten der zwei untersuchten *Lepidium*-Arten (s.o.) kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine unterschiedliche *FUL*-Expression in den zwei *Lepidium*-Arten vorliegt. Eine kleinräumige Expressionserweiterung in *L. appelianum*-Fruchtklappen in Richtung Replum (bis in den bei *L. campestre*-Öffnungsfrüchten nur zwei bis vier Zellschichten breiten Dehiszenzzonenbereich) wäre äußerst schwierig nachzuweisen, aber bereits eine solche räumliche Expressionserweiterung von *FUL* um genau diesen Bereich könnte ausreichen, einen schließfrüchtigen Phänotypen wie bei *35S::FUL*-Mutanten zu erhalten (FERRANDIZ *et al.* 2000). Nach dieser *FUL*-Hypothese (**Abb. 4.1**) könnte FRUITFULL, wie bei *Arabidopsis* Mutanten nachgewiesen, als downstream-Inhibitor für *SHP1* und *SHP2* fungieren, was zur Folge hätte, dass die *SHP*-Gene nicht exprimiert werden (FERRANDIZ *et al.* 2000). Die Ausbildung einer Dehiszenzzone bliebe aus, was letztendlich zu Schließfrüchten führt. Da die Expression von *FUL* wiederum von den oben erwähnten Genen *YAB3*, *FIL* und *JAG* positiv reguliert wird (DINNENY *et al.* 2005), können auch diese Gene bei der Evolution von Schließfrüchten nicht *a priori* ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend könnte eine auf den Dehiszenzzonen-Bereich räumlich begrenzte gain-of-function-Mutation zumindest eines der oben genannten regulatorischen Gene (*trans*-regulatorische Faktoren) für die Evolution von Indehiszenz verantwortlich sein (*RPL*- und *FUL*-Hypothese). Nach dem Parsimoniekriterium (Sparsamkeitskriterium) kann die *FUL*-Hypothese mit nur einer vorausgesetzten Mutation / Expressionsänderung – im Gegensatz zu mindestens zwei Mutationsereignissen bei der *RPL*-Hypothese – favorisiert werden. Aus diesem Grund sollte in den anschließenden Funktionsstudien (heterologe Transformationsstudien) mit dem Gen *FRUITFULL* begonnen werden.



**Abb. 4.1** Schema der genetischen Regulation von *Arabidopsis*-Öffnungsfrüchten (a) sowie Hypothesen zur Evolution der genetischen Regulation der Fruchttöfung in *L. appelianum* (b, c). (a) Genetische Regulation der Fruchttöfung in *Arabidopsis* Öffnungsfrüchten. Die Expression der Fruchtentwicklungsgene ist räumlich z.T. stark begrenzt. **RPL-Hypothese:** Die Expression von *RPL* ist auf die DZ erweitert. Diese Hypothese setzt eine vorangegangene Mutation voraus (z.B. in *BP*), die als Prädisposition in allen *Lepidium*-Arten vorliegen könnte. Die Fruchtklappenrand-Identitätsgene (*SH<sub>P</sub>1*, *SH<sub>P</sub>2*, *ALC*, *IND*) werden im DZ-Bereich nicht exprimiert, ebenso wie bei der **FUL-Hypothese:** Hier werden die Fruchtklappenrand-Identitätsgene durch eine Expressionserweiterung von *FUL* auf den DZ-Bereich unterdrückt. In beiden Fällen unterbleibt die Ausbildung einer Dehissenzone mit verholzten Fruchtklappenrandzellen und Trennschicht; es kommt zur Ausbildung von Schließfrüchten.

Es kommen aber auch Mutationen, die zu Änderungen in *cis*-regulatorischen Bereichen geführt haben, als mögliche Ursachen für die Evolution von Schließfrüchten in den Brassicaceen in Betracht, wie z.B. für das Gen *AGAMOUS* beschrieben (s.o.). Eine solche Änderung kann selbstverständlich auch in einem Gen stattgefunden haben, dessen Funktion bislang unbekannt ist bzw. noch nicht näher untersucht wurde.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind Vorarbeiten, die im Rahmen einer ersten Projektperiode durchgeführt wurden. Diese Vorarbeiten lassen Rückschlüsse auf die wahrscheinlichsten Kandidatengene zu, die nach unserer Einschätzung an der Evolution von Schließfrüchten in *Lepidium appelianum* respektive den Brassicaceen beteiligt sind. Die Anzahl der in Frage kommenden Fruchtentwicklungsgene (*ALC*, *FUL*, *IND*, *RPL*, *SHP1*, *SHP2*) konnte mittels Expressionsanalysen (*in situ* Hybridisierung, Northern Analysen) auf zwei Gene, ***FRUITFULL*** und ***REPLUMLESS***, eingrenzt werden. Beide Gene besitzen die Fähigkeit, mit *SHP1* und *SHP2* die zwei in der Regulationskaskade für die Dehiszenzzone wichtigsten Gene zu unterdrücken (FERRANDIZ *et al.* 2000; ROEDER *et al.* 2003), Unterschiede in der Genexpression sind jedoch erst bei Target-Genen von *RPL* und *FUL* zu finden. Kleinräumige Expressionserweiterungen (auf den Dehiszenzonen-Bereich bei *L. appelianum*) sind für *FUL* nicht nachweisbar, hier wäre bereits eine kleinräumige Expressionserweiterung um 2-4 Zellschichten für die Ausbildung von indehiszenten Früchten ausreichend, um Schließfrüchte zu entwickeln. Ebenso konnte eine Expression von *RPL* in Fruchtquerschnitten nicht nachgewiesen werden, in Längsschnitten von Infloreszenzmeristemen ist die Expression von *RPL* jedoch ähnlich.

Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse sollten heterologe Transformationen nachfolgender Studien zunächst auf *FUL* und *RPL* begrenzt bleiben. Sollten diese Analysen allerdings keine Hinweise auf eine Beteiligung dieser Gene an der Evolution von Schließfrüchten in *L. appelianum* ergeben, so sollten die Versuche auf die upstream-Regulatoren *YAB3*, *FIL* und *JAG* ausgeweitet werden. Auch eine Ausweitung auf Transformationsversuche mit den *SHP*-Genen ist in Betracht zu ziehen, da diese in *L. appelianum* eine von Öffnungsfrüchten (z.B. von *A. thaliana*, *L. campestre*) abweichende Expression zeigen. Transformationsstudien mit den

Downstream-Targets der *SHP*-Gene, *ALC* und *IND*, sollten hingegen zunächst zurückgestellt werden, da sie offenbar nicht direkt an der Evolution von Schließfrüchten in *L. appelianum* beteiligt sind.

Zur Vereinfachung der Transformationsstudien könnte nach erfolgreicher Etablierung eines Transformationssystems für *Lepidium* ein System angewendet werden, bei dem temperatur-sensitive *FUL*- oder *RPL*-Mutanten hergestellt werden. Solche Versuche konnten für *Antirrhinum* mit temperatur-sensitiven *DEFICIENS*-Mutanten erfolgreich durchgeführt werden (ZACHGO *et al.* 1995; BEY *et al.* 2004). So könnte bereits durch ein einfaches Ändern von Wachstumsbedingungen (im vorliegenden Fall die Temperatur) der Phänotyp verändert werden, sofern das untersuchte Gen funktionale Änderungen verursacht.

#### 4.4.1 Genetische Regulation heterokarper *Aethionema*-Früchte

Besondere Fruchtstände findet man unter anderem in *Aethionema carneum*; diese heterokarpe Art entwickelt im selben Fruchtstand Öffnungs- und Schließfrüchte. Nun stellt sich die Frage, wie es die Pflanze gewährleistet, am Fruchtstand zunächst Öffnungsfrüchte mit jeweils bis zu vier Samen auszubilden, im späteren Verlauf dann jedoch vornehmlich einsamige Schließfrüchte (schließfrüchtige Nusschötchen) zu produzieren (ZOHARY 1937; ZOHARY & FAHN 1950). Überdies zeigen die Samen unterschiedliche Eigenschaften im Keimungsverhalten (Heterospermie): die Samen aus Schließfrüchten keimen in der Regel etwa 15 Tage später als diejenigen aus Öffnungsfrüchten (ZOHARY & FAHN 1950), und auch der Verschleimungsgrad der Samen aus den verschiedenen Früchten ist unterschiedlich. Die notorrhizen Samen der Öffnungsfrüchte verschleimen (rückenwurzelig: die Radicula liegt einem der Keimblätter an), wohingegen die pleurorrhizen Samen aus Schließfrüchten (seitenwurzelig: die Radicula liegt den Seiten der Keimblätter an) nicht verschleimen (ZOHARY 1937). Sowohl bei verschleimenden Samen aus Öffnungsfrüchten als auch bei nicht-verschleimenden Samen aus Schließfrüchten von *Ae. carneum* konnte bei der Keimung zunächst das Erscheinen der Radicula beobachtet werden (vgl. **Abb. 3.18**).

In der Gattung *Aethionema* kommt Heterokarpie wiederholt vor (vgl. **1.7**). Allerdings liegt bislang keine vollständige Gattungsmonographie vor, so dass es schwierig ist,

etwas über den Ursprung von Heterokarpie abzuleiten. Zwar sind in verschiedenen Arbeiten zu asiatischen Brassicaceen auch Daten heterokarper *Aethionema*-Arten in die Phylogenien eingeflossen (KHOSRAVI *et al.* 2008b; KHOSRAVI *et al.* 2008a; KHOSRAVI *et al.* 2009), allerdings ist die Anzahl der verwendeten *Aethionema*-Taxa zu gering, um eine Aussage zur Monophylie von Heterokarpie zu treffen. Nach KHOSRAVI *et al.* (2008a; 2009) bilden die annuellen, heterokarpen Taxa *Ae. carneum*, *Ae. saxatile* sowie das teilweise als heterokarp beschriebene *Ae. arabicum* zusammen mit *Ae. umbellatum* (Boiss.) Bornm. und *Ae. semnanensis* Mozaff. eine monophyletische Gruppe. Da der Switch von Öffnungsfrüchten zu Schließfrüchten innerhalb eines einzelnen Fruchtstandes übergangslos abläuft, kann man *a priori* eine recht einfache genetische Regulation für die Entwicklung der unterschiedlichen Früchte annehmen (KOLKMEYER 2009). Ein mögliches Szenario für die Regulation von Öffnungs- und Schließfrüchten, basierend auf den anatomischen Ergebnissen von KOLKMEYER (2009), könnte auch bei *Aethionema carneum* mit Hilfe des Mutantensystems aus *Arabidopsis* erklärt werden. Die Öffnungsfrüchte von *Aethionema carneum* bilden keinen deutlich ausgeprägten lignifizierten Fruchtklappenrand aus, wie dies bei *Arabidopsis* bekannt ist. Vielmehr lignifiziert, wie bei Öffnungsfrüchten von *Aethionema saxatile*, ein Teil des Mesokarps (**Abb. 3.17 a**), welcher auch bei *Ae. carneum* die Funktion der verholzten Fruchtklappenrandzellen zu übernehmen scheint (MÜHLHAUSEN *et al.* 2008; KOLKMEYER 2009). Bei *Arabidopsis* wird die Ausbildung dieser verholzten Fruchtklappenrandzellen durch *IND* gesteuert, die Ausbildung der Trennschicht wird durch *ALC* reguliert (RAJANI & SUNDARESAN 2001; LILJEGREN *et al.* 2004). Es ist denkbar, dass die ektopische Expression von *IND* in den Früchten zur Verholzung des Mesophylls führt, ein Phänotyp, der einer indehiszenten *Arabidopsis ful* Mutante entspricht (LILJEGREN *et al.* 2004). Die Ausbildung einer Trennschicht, die für die Öffnung der Früchte zwingend nötig ist (**Abb. 3.17 a**), wird in Öffnungsfrüchten von *Aethionema carneum* vermutlich weiterhin durch *ALC* vermittelt (MÜHLHAUSEN *et al.* 2008). Schließfrüchte von *Aethionema carneum* hingegen bilden keine Trennschicht aus (**Abb. 3.17 b**) und zeigen einen ähnlichen Phänotypen, wie für *Arabidopsis* Doppelmutanten (*ful alc*) gezeigt werden konnte (LILJEGREN *et al.* 2004). Überträgt man die für *Aethionema saxatile* postulierte genetische Regulation (MÜHLHAUSEN *et al.* 2008) auf *Ae. carneum*, so könnte man mit einem relativ einfachen genetischen Regulationssystem die anatomischen Unterschiede von Öffnungs- und

Schließfrüchten erklären. Allerdings bedarf es intensiver molekularer Untersuchungen (Expressionsanalysen, heterologe Transformationen), um die genetische Regulation für die Entwicklung von Heterokarpie in *Aethionema* vollständig aufzuklären. Interessant ist dabei die Aufklärung der Regulation auf physiologischer Ebene, denn hier öffnen sich ganz neue Perspektiven der Grundlagenforschung. Wie erfolgt der plötzliche Übergang von Öffnungsfrüchten zu Schließfrüchten, auch im Zusammenhang mit der Ausbildung unterschiedlicher Samenphänotypen wie verschleimende bzw. nicht verschleimende Samen und unterschiedliche Dormanztypen? Was sind die Auslöser für diese geänderten physiologischen Prozesse, ist dieser Mechanismus abhängig von abiotischen Faktoren wie Temperatur und Wasserverfügbarkeit und ist dieser Übergang reversibel?

Bei der Anzucht von *Aethionema carneum* im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass im terminalen Bereich von Fruchtständen wieder Öffnungsfrüchte auftreten können, auch wenn zuvor bereits Schließfrüchte und auch Öffnungsfrüchte ausgebildet wurden. Diese Beobachtung könnte mit einer erhöhten Wasserverfügbarkeit für die Pflanzen zusammenhängen (evtl. verursacht durch stärkeres Gießen). Der erneute Übergang hin zur Produktion von Öffnungsfrüchten bei erhöhter Wasserverfügbarkeit könnte mit der schnelleren Keimfähigkeit der Samen aus Öffnungsfrüchten erklärt werden. Eine schnelle Keimung von Samen aus Öffnungsfrüchten nach der Reife könnte das Überleben der Keimlinge bei ausreichender Befeuchtung ermöglichen und die Entwicklung einer neuen Generation von Pflanzen begünstigen.

Sind *Arabidopsis*-Mutanten mit potentiellen Kandidatengenen aus *Aethionema* in der Lage, heterokarpe Fruchtstände hervorzubringen? Diesen Fragen bedarf es in nachfolgenden Studien nachzugehen. Kenntnisse über die genaue genetische Regulation von Öffnungs- und Schließfrüchten könnten auch neue Hinweise auf die wiederholte Evolution von Schließfrüchten in den Brassicaceen liefern.

#### **4.5 Ökologie der Samenausbreitung – Dehiszenz, Indehiszenz und Heterokarpie**

Das wichtigste Ziel bei der Samenausbreitung ist, dass eine Pflanze ihren Diasporen, mit denen sie ein Fortdauern der Art ermöglicht, die Fähigkeit mit auf den Weg gibt, an einen für die Keimung besonders günstigen Ort zu gelangen (GUTTERMAN 1993). Können verschiedene Fruchtformen wie Öffnungs- und Schließfrüchte also als

ökologische Anpassungen an die jeweiligen Standorte angesehen werden, oder sind die unterschiedlichsten Fruchtöffnungssysteme bis hin zu den heterokarpen Früchten z.B. von *Aethionema carneum* vielmehr „eine Laune der Natur“?

Eine generelle Aussage hierüber zu treffen ist sicherlich schwierig. Es müssen immer auch artspezifische Aspekte einfließen, generelle ökologische Anpassungen an bestimmte ökologische Faktoren scheint es nur zum Teil zu geben.

Zum Beispiel tritt Myxospermie (Verschleimung von Samen) stark gehäuft bei winterannuellen Pflanzen trockener Standorte auf. In diesen Gebieten konnte gezeigt werden, dass das Verschleimen von Samen dazu führt, dass die Samen einerseits in der Nähe der Mutterpflanze am Boden anhaften, wie z. B. bei *Plantago coronopifolia*, *Carrichtera annua* oder *Anastatica hierochuntica*, was eine Fernausbreitung (Telechorie) unterbinden würde (ZOHARY 1937; GUTTERMAN 1993; GUTTERMAN & SHEM-TOV 1997b; GUTTERMAN & SHEM-TOV 1997a; VAN RHEEDE VAN OUDTSHOORN & VAN ROOYEN 1999; GUTTERMAN 2002). Zusätzlich gewährleistet dies bei kontinuierlicher Befeuchtung des Bodens eine schnelle Keimung, was zudem den Fraß der Samen durch Ameisen verhindern kann. Allerdings können Samen, sofern sie bei auftretenden Regenfällen noch nicht auf dem Boden angelangt sind, auch mit dem Wasser fortgeschwemmt werden, was sicherlich einen Ferntransport darstellen würde (GUTTERMAN & SHEM-TOV 1997b).

Dass verschleimende Samen, wie sie auch in den zwei untersuchten *Lepidium*-Arten auftreten, auch dem Ferntransport über tausende von Kilometern dienlich sein können, konnte explizit für *Lepidium* gezeigt werden. So gilt es als wahrscheinlich, dass Samen kalifornischer und afrikanischer *Lepidium*-Arten im Gefieder von Wasservögeln nach Australien verfrachtet wurden (Exozoochorie), wo durch Hybridisierung neue, in Australien endemische Arten entstehen konnten (MUMMENHOFF *et al.* 1992; MUMMENHOFF *et al.* 2004; MUMMENHOFF & FRANZKE 2007; DIERSCHKE *et al.* 2009). Auch wird der Verlust des Pappus bei Asteraceen-Gattungen mit verschleimenden Samen als Hinweis dafür gesehen, dass es sich bei den verschleimenden Samen um eine Anpassung an den Ferntransport handelt (GRUBERT 1974).

Allerdings zeigen auch eng verwandte Arten bezüglich der Myxospermie Unterschiede, obwohl die Arten in sehr ähnlichen Habitaten vorkommen. Viele Arten der Gattung *Heliophila* mit seinen etwa 73 Arten kommen in den trockenen Gebieten Südafrikas und Namibias vor (MUMMENHOFF *et al.* 2005). Der Grad der

Verschleimung der Samen ist hier jedoch nicht von klimatischen Bedingungen abhängig, sondern korreliert vielmehr mit der Größe der Beflügelung der Samen (VAN RHEEDE VAN OUDTSHOORN & VAN ROOYEN 1999). Eine generelle Bewertung der Evolution von Myxospermie ist aus diesem Grund schwierig, spezifische Anpassung einzelner Arten können sowohl als den Ferntransport fördernd, aber auch als den Ferntransport verhindernd betrachtet werden. Dies führt soweit, dass einzelne Arten wie *Erucaria microcarpa* Boiss. gleichzeitig einerseits verschleimende Samen (im unteren Teil der Frucht) produzieren, die bei Regen ausgebreitet werden und nahe der Mutterpflanze zur Keimung kommen und andererseits einen im oberen schließfrüchtigen Teil der Frucht verbleibenden Samen, der erst sehr viel später zur Keimung kommt. Diese Keimungsverzögerung wird wahrscheinlich durch keimungshemmende Substanzen im Perikarp ausgelöst, die Keimung der Samen ist erst nach dem Auswaschen dieser Substanzen aus der Fruchtschale möglich. Häufig werden diese Samen auch von Ameisen gesammelt, was einem Ferntransport zumindest nahekommt (ZOHARY 1937; GUTTERMAN 1993; GUTTERMAN 2002).

Auch die Produktion von Öffnungs- und Schließfrüchten kann in Bezug auf die Ausbreitung von Pflanzen in zweierlei Richtung interpretiert werden. Einerseits werden Schließfrüchte gerade bei Pflanzen arider Gebiete als hinderlich für eine Fernausbreitung angesehen, wenn ihnen morphologische Strukturen wie etwa Haken oder Runzeln auf der Fruchtschale fehlen. Das Fehlen solcher morphologischer Strukturen scheint vielmehr eine Anpassung an Atelechorie (Verhinderung der Fernausbreitung) zu sein (ELLNER & SHMIDA 1981). Die Abwesenheit solcher Strukturen an den Fruchtschalen könnte die Vermutung zulassen, dass es sich um eine Anpassung an aride Gebiete mit unregelmäßigen Niederschlägen handelt (MÜHLHAUSEN *et al.* 2008). Der lokale, von der Mutterpflanze etablierte Standort könnte somit wertvoller für eine Art sein und durch den Verbleib der Samen nahe der Mutterpflanze weiterhin besiedelt werden. Eine Neubesiedlung entfernter Standorte (Fernausbreitung) wäre dann kein Primärziel für die Spezies mehr. Übereinstimmend hierzu diskutieren APPEL & AL-SHEHBAZ (2003), dass bestimmte morphologische Strukturen dazu dienen können, dass sich ganze Ausbreitungseinheiten (Früchte bzw. Fruchtstände) im Gefieder oder Fell von Tieren verfangen können (Exozoochorie) und dadurch die Fernausbreitung gewährleistet wird.

Die Schließfrüchte von *L. appelianum* weisen keinerlei morphologische Strukturen auf ihrer Fruchtschale auf, allerdings produzieren sie noch verschleimende Samen (vgl. **Abb. 2.1**). Dies ist zunächst verwunderlich, da *L. appelianum* auch in Kanada heimisch ist (MULLIGAN & FINDLAY 1974; FRANCIS & WARWICK 2008), einer Gegend die nicht durch Wüsten charakterisiert ist. Die Hauptverbreitung liegt vielmehr im asiatischen Raum (China, Kasachstan, Mongolei, West-Sibirien), Gegenden mit allerdings vergleichbaren klimatischen Bedingungen wie im Norden Amerikas. Hier ist mit langen Wintern zu rechnen, was diese Regionen zumindest in einem Großteil des Jahres physiologisch zu trockenen Regionen macht.

So könnte es sich bei der Ausbreitungsstrategie von *L. appelianum* um ein Beispiel für Ästatiphorie handeln (ZOHARY 1937). Bei ästatiphoren Pflanzen verbleiben die reifen Früchte auf der Mutterpflanze. Die Samen werden erst nach der Verrottung der Fruchtschalen freigesetzt, meist erst im Herbst oder Winter. Auch die reifen Samen von *L. appelianum* verbleiben in den geschlossenen Früchten sehr lange auf den Mutterpflanzen, die Samen werden erst nach ausreichend starker Verrottung der Fruchtschale freigesetzt (MUMMENHOFF *et al.* 2009). Der durch die Frucht gegebene Schutz könnte eine frühzeitige Keimung und ein damit verbundenes Absterben der jungen Keimlinge verhindern. Da Verrottungsprozesse der Fruchtklappengewebe immer auch Wasser und gewisse Temperaturen benötigen ist es vorstellbar, dass eine Verrottung der Fruchthüllen gleichbedeutend ist mit „guten“ Keimungsbedingungen, die sich erst mit dem Auftreten physiologisch verfügbaren Wassers einstellen (HENSEN 1999).

Die noch immer verschleimenden Samen aus Schließfrüchten von *L. appelianum* könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Entstehung von Indehiszenz in *L. appelianum* erst vor kurzem stattgefunden hat (THELLUNG 1906). Berechnungen der Nukleotid-Divergenz (K2P-Nukleotid-Divergenz, (KIMURA 1980)) des ITS-Kernmarkers (Internal Transcribed Spacer) von *L. campestre* und *L. appelianum* ergaben einen Unterschied von 3,87% (MUMMENHOFF *et al.* 2009). Nimmt man eine molekulare Uhr für den ITS-Marker bei krautigen Pflanzen von 1% Sequenzdivergenz pro 0,6-1,1 Millionen Jahren an (ZHANG *et al.* 2001; MUMMENHOFF *et al.* 2004; KAY *et al.* 2006), so existierte der letzte gemeinsame Vorfahre von *L. appelianum* und *L. campestre* vor etwa 2,3 – 4,3 Millionen Jahren. Damit könnte die Entstehung der beiden Arten im Pliozän oder Pleistozän stattgefunden haben und damit noch in das Quartär fallen (PILLANS & NAISH 2004).

Die in *Aethionema carneum* Schließ- und Öffnungsfrüchten vorgefundenen spezifischen Samentypen scheinen ähnliche unterschiedliche Ausbreitungsstrategien zu verfolgen wie z.B. für *Erucaria microcarpa* beschrieben (s.o.). Auch in *Aethionema carneum* findet man verschleimende Samen in den Öffnungsfrüchten, die Samen aus Schließfrüchten verschleimen nicht. Darüber hinaus konnte bei Anzuchten mit Samen aus beiden Fruchttypen festgestellt werden, dass die Samen aus Schließfrüchten deutlich später keimen als diejenigen aus Öffnungsfrüchten. Dies könnte daran liegen, dass eine unterschiedlich ausgebildete Dormanz in beiden Samentypen vorliegt. Dass Samen mit unterschiedlichen Eigenschaften wie Dormanz oder Verschleimungspotential gebildet werden, ist ein bekanntes Phänomen bei Heterokarpie, vor allem bei einjährigen Arten semiarider bis arider Standorte (VAN DER PIJL 1972). Dabei ist bei allen heterokarpen Arten zumeist eine Fruchtform an Telechorie, eine andere an Atelechorie angepasst. Die Samen der fernausgebreiteten Früchte dienen dabei der Erschließung neuer Habitate (DE CLAVIJO 1994).

Dies steht im Einklang mit der sogenannten "bet-hedging"-Strategie" (auch "high-risk/low-risk"), nach der die Pflanzen unterschiedliche Strategien bezüglich der Samenausbreitung anwenden, um in jedem Fall das Überleben der Nachkommen zu gewährleisten (VENABLE & LEVIN 1985; IMBERT 2002; VENABLE 2007; LU *et al.* 2010). Die Samen der Öffnungsfrüchte besitzen ein hohes Keimungspotential, sie können ein Habitat schnell besiedeln. Die Samen der Schließfrüchte keimen sehr viel später, wahrscheinlich auch bedingt durch keimungshemmende Substanzen, die im Perikarp vorhanden sein können (VENABLE & LEVIN 1985; IMBERT 2002; VENABLE 2007; LU *et al.* 2010), aber auch weil die Keimung erst stattfinden kann, wenn die Samen aus den Früchten entlassen wurden. Welche Samen nun an Telechorie bzw. Atelechorie angepasst sind muss spezifisch bestimmt werden, allgemeine Schlussfolgerungen können nicht getroffen werden.

Bei *Aethionema carneum* scheinen die Schließfrüchte an Fernausbreitung (Telechorie) angepasst zu sein. Die Zähne an den Rändern der zu einem einsamigen Nusschötchen verwachsenen Fruchtklappen (**Abb. 3.18 a**) können sich leicht im Fell von Tieren verfangen und so über weite Strecken transportiert werden. Zwar besitzen auch die Fruchtklappen der Öffnungsfrüchte solche Zähne, jedoch fallen die Samen bei Fruchtreife aus den sich öffnenden Früchten heraus. Ein Ferntransport bei diesen Samen ist damit eher unwahrscheinlich. Die unzähligen kleinen verschleimenden

„Ärmchen“ der Samen aus Öffnungsfrüchten könnten zusätzlich der Verankerung am Boden dienen. Durch die Oberflächenvergrößerung, hervorgerufen durch die vielen kleinen „Ärmchen“, wird ein fester Kontakt zwischen Bodenoberfläche und Samenkorn erreicht. Die Öffnungsfrüchte von *Aethionema carneum* könnten somit als eine Anpassung an Atelechorie verstanden werden.

#### 4.6 Vorzeitige Fruchttöffnung und Herstellung von GVOs

Die vorzeitige Fruchttöffnung bei landwirtschaftlich genutzten Pflanzen in Verbindung mit dem daraus resultierenden Ernteverlust für die Landwirtschaft verursacht einen immensen Schaden. So beziffern PRICE *et al.* (1996) allein die Verluste durch den unterschiedlichen Reifezeitpunkt der Früchte bei Raps auf 11-25%, wenn darüber hinaus die Wetterbedingungen kurz vor und während der Fruchtreife ungünstig sind und sich dadurch die Ernte verzögert, kann sich der Wert auf bis zu 50% erhöhen (MACLEOD 1981). Die genetische Regulation der Fruchttöffnung ist für *Arabidopsis* bekannt und eingehend beschrieben (GU *et al.* 1998; LILJEGREN *et al.* 2000; RAJANI & SUNDARESAN 2001; ROEDER *et al.* 2003; LILJEGREN *et al.* 2004). Tatsächlich konnte anhand verschiedener *Arabidopsis* Mutanten gezeigt werden, dass mit loss-of-function- (Funktionsverlust) bzw. gain-of-function-Mutanten (Funktionshinzugewinn) gezielt Phänotypenänderungen hervorgerufen werden können. Eine solche Änderung an einzelnen Genen ist auch außerhalb von *Arabidopsis* bei *Brassica juncea* (brauner Senf) gelungen. So konnte in genetisch veränderten *B. juncea*-Individuen das Gen *FRUITFULL* mittels *35S::FUL*-Konstrukten ektopisch zur Expression gebracht werden (gain-of-function-Mutante), was einerseits zu öffnungsresistenten Früchten führte (de facto also zu Schließfrüchten) (OSTERGAARD *et al.* 2006), andererseits aber auch als Hinweis interpretiert werden kann, dass die aus *Arabidopsis* bekannte genetische Regulation, die zur Ausbildung des Fruchtklappenrandes und der Dehiszenzzone führt, auch in *Brassica* konserviert ist. Die systematische Beziehung von *Arabidopsis*, *Lepidium* (lineage I) und *Brassica* (lineage II) (BEILSTEIN *et al.* 2006; FRANZKE *et al.* 2009; COUVREUR *et al.* 2010) lässt somit zumindest für Öffnungsfrüchte eine zu *Arabidopsis* ähnliche genetische Regulation in *Lepidium* vermuten.

Durch Transformation (Einschleusen von Konstrukten bzw. veränderten oder artfremden Genen) hergestellte Mutanten können ein Mittel sein, um Ernteverluste entgegenzuwirken und finanziellen Schaden in der Landwirtschaft zu minimieren.

Allerdings wird diese Herangehensweise in der Öffentlichkeit kontrovers diskutiert. Von Seiten der Hersteller wird der Vorteil für die Menschheit betont. So könnten Landwirte ihre Erträge steigern und Kosten sparen, indem weniger Herbizide verwendet werden müssen. Es müssen jedoch auch die Nachteile berücksichtigt werden, wesentliche Aspekte, die nach dem derzeitigen Stand der Forschung nur zum Teil verstanden sind. Ist das Risiko gentechnisch veränderter Mais-Sorten für die Umwelt aufgrund fehlender nah verwandter Arten in Mitteleuropa noch überschaubar, so sind die Folgen für die Umwelt – spätestens bei der Verwendung von gentechnisch verändertem Raps – nicht eindeutig absehbar. Insbesondere für Raps (*Brassica napus* L.) konnte gezeigt werden, dass er mit nah verwandten Arten (*Brassica rapa* L.) auch in natürlichen Populationen Hybride bilden kann (HANSEN *et al.* 2001; HANSEN *et al.* 2003; ELLING 2008; ELLING *et al.* 2010). Somit könnte zwar einerseits die Produktion und der Anbau solcher genetisch veränderten Sorten zu erhöhten Erträgen führen (in diesem Beispiel durch geringere Verluste durch vorzeitige Fruchtöffnung), wie am Beispiel *Brassica juncea* von Ostergaard *et al.* (2006) gezeigt, andererseits ist es jedoch nicht ausgeschlossen, dass diese veränderten Gene durch Genfluss in Wildarten gelangen und dort nicht planbare Änderungen für die Natur hervorrufen. Arten, die plötzlich Schließfrüchte produzieren, könnten Nachteile bekommen, da deren Samen keine Anpassung an das Durchbrechen einer Fruchtschale besitzen. Im Wettbewerb mit anderen Arten könnte dies gravierende Folgen für Populationen bedeuten, die vom Menschen in Kulturpflanzen eingebrachte Gene aus Kulturpflanzen akkumulieren.

## 5 Zusammenfassung

In *Lepidium campestre* und *Lepidium appelianum* konnten insgesamt acht Fruchtentwicklungsgene isoliert werden. Diese untersuchten Gene sind wahrscheinlich allesamt Orthologe zu Fruchtentwicklungsgenen aus *Arabidopsis thaliana*. Ein isoliertes *SHP*-Gen aus *Aethionema carneum* ist wahrscheinlich ortholog zu *SHP2* aus *Arabidopsis thaliana*. Dieses Gen (*AecSHP2*) könnte ein Abkömmling des letzten gemeinsamen Vorfahren von *Aethionema* und den restlichen Brassicaceen sein, welches mit Ausnahme der Gattung *Aethionema* in den Brassicaceen duplizierte.

Allein aufgrund der Aminosäuresequenzen lassen sich keine direkten Rückschlüsse auf die Beteiligung einzelner Gene an der Evolution von Schließfrüchten ziehen. Wahrscheinlicher sind regulatorische Änderungen eines oder mehrerer Fruchtentwicklungsgene innerhalb der Früchte von *L. appelianum*, die zur Ausbildung von indehiszenten Früchten führen.

Für die untersuchten Arten der Gattung *Lepidium* konnte die Methode der Expressionsanalysen (*in situ* Hybridisierung) etabliert werden. Expressionsstudien lassen eine ähnliche genetische Regulation der Fruchtöffnung von *Lepidium campestre* und *Arabidopsis thaliana* vermuten, diese Regulation scheint in Öffnungsfrüchten von *Lepidium campestre* konserviert zu sein. Aufgrund einer ähnlichen Regulation in der Gattung *Brassica* ist es möglich, dass die genetische Regulation von Öffnungsfrüchten innerhalb der Core Brassicaceae konserviert ist.

Die genetische Regulation von *Lepidium appelianum* ist bislang nicht geklärt. Zum Verständnis der Evolution von Schließfrüchten in *Lepidium* sind umfangreiche heterologe Transformationsversuche notwendig. Diese heterologen Transformationsversuche sollten zunächst mit den für die Evolution von Schließfrüchten in Frage kommenden Kandidatengenen durchgeführt werden, nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind dies die Gene *FRUITFULL* und *REPLUMLESS*.

Die Fruchtanatomie heterokarper Früchte in verschiedenen *Aethionema*-Arten scheint einer ähnlichen genetischen Regulation zu folgen. Hierauf deuten anatomische Untersuchungen von *Ae. carneum*- und *Ae. saxatile*-Früchten hin.

## 6 Literaturverzeichnis

- AL-SHEHBAZ, I. A., 1986. The genera of Lepidieae (Cruciferae, Brassicaceae) in the Southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* **67**: 265-311.
- AL-SHEHBAZ, I. A. & K. MUMMENHOFF, 2005. Transfer of the South African genera *Brachycarpaea*, *Cycloptychis*, *Schlechteria*, *Silicularia*, and *Thlaspeocarpa* to *Heliophila* (Brassicaceae). *Novon* **15**: 385-389.
- AL-SHEHBAZ, I. A. & K. MUMMENHOFF, 2011. *Stubendorffia* and *Winklera* belong to the expanded *Lepidium* (Brassicaceae). *Journal of Botany*, in press.
- AL-SHEHBAZ, I. A., K. MUMMENHOFF & O. APPEL, 2002. *Cardaria*, *Coronopus*, and *Stroganowia* are united with *Lepidium* (Brassicaceae). *Novon* **12**: 5-11.
- ALONSO-CANTABRANA, H., J. J. RIPOLL, I. OCHANDO, A. VERA, C. FERRANDIZ & A. MARTINEZ-LABORDA, 2007. Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the *Arabidopsis* *ASYMMETRIC LEAVES1* gene. *Development* **134**: 2663-2671.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R., S. PELAZ, S. J. LILJEGREN, S. E. GOLD, C. BURGEFF, G. S. DITTA, L. R. DE POUPLANA, L. MARTINEZ-CASTILLA & M. F. YANOFSKY, 2000. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 5328-5333.
- ANDRES, L. A., E. M. COOMBS & J. P. MCCAFFREY, 1995. Mediterranean sage *Salvia aethiopsis* L. (Labiatae), pp. 296 - 298. In: J. R. Nechols, L. A. Andres, J. W. Beardsley, R. D. Goeden and C.G. Jackson (eds). *Biological control in the U.S. Western Region: accomplishments and benefits of Regional Research Project W-84, 1964-1989*. Oakland: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3361, 356 pp.
- APPEL, O. & AL-SHEHBAZ, I. A., 2003. Cruciferae. In: K. Kubitzki and C. Bayer (eds). *Families and Genera of Vascular Plants*. 5: 75-174. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- ATCHLEY, W. R. & W. M. FITCH, 1997. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 5172-5176.
- ATCHLEY, W. R., W. TERHALLE & A. DRESS, 1999. Positional Dependence, Cliques, and Predictive Motifs in the bHLH Protein Domain. *Journal of Molecular Evolution* **48**: 501-516.
- BALTIMOR, D., 1970. Viral RNA-dependent DNA Polymerase - RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature* **226**: 1209-1211.
- BAO, X. Z., R. G. FRANKS, J. Z. LEVIN & Z. C. LIU, 2004. Repression of *AGAMOUS* by *BELLRINGER* in floral and inflorescence meristems. *Plant Cell* **16**: 1478-1489.
- BARRERO, J. M., A. A. MILLAR, J. GRIFFITHS, T. CZECHOWSKI, W. R. SCHEIBLE, M. UDVARDI, J. B. REID, J. J. ROSS, J. V. JACOBSEN & F. GUBLER, 2010. Gene expression profiling identifies two regulatory genes controlling dormancy and ABA sensitivity in *Arabidopsis* seeds. *Plant Journal* **61**: 611-622.
- BARTLEY, M. & N. CROSS, 2006. NaviKey v. 4.08 software. Harvard University Herbarium, Boston, USA.
- BASKIN, J. M. & C. C. BASKIN, 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* **14**: 1-16.
- BATEMAN, A. J., 1955. Self-incompatibility in Angiosperms III. Cruciferae. *Heredity* **9**: 53-68.

- BEILSTEIN, M. A., I. A. AL-SHEHBAZ & E. A. KELLOGG, 2006. Brassicaceae phylogeny and trichome evolution. *American Journal of Botany* **93**: 607-619.
- BEILSTEIN, M. A., N. S. NAGALINGUM, M. D. CLEMENTS, S. R. MANCHESTER & S. MATHEWS, 2010. Dated molecular phylogenies indicate a Miocene origin for *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 18724-18728.
- BELLAOUI, M., M. S. PIDKOWICH, A. SAMACH, K. KUSHALAPPA, S. E. KOHALMI, Z. MODRUSAN, W. L. CROSBY & G. W. HAUGHN, 2001. The *Arabidopsis BELL1* and *KNOX TALE* homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *Plant Cell* **13**: 2455-2470.
- BERBEN, G., M. LEGRAIN, V. GILLIQUET & F. HILGER, 1990. The Yeast Regulatory Gene *PHO4* Encodes a Heliy-Loop-Helix Motif. *Yeast* **6**: 451-454.
- BERTOLINO, E., B. REIMUND, D. WILDT-PERINIC & R. G. CLERC, 1995. A Novel Homeobox Protein Which Recognizes a TGT Core and Functionally Interferes with a Retinoid-responsive Motif. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 31178-31188.
- BEY, M., K. STUBER, K. FELLENBERG, Z. SCHWARZ-SOMMERA, H. SOMMER, H. SAEDLER & S. ZACHGO, 2004. Characterization of *Antirrhinum* petal development and identification of target genes of the class B MADS box gene *DEFICIENS*. *Plant Cell* **16**: 3197-3215.
- BHATT, A. A., J. P. ETHELLES, C. CANALES, A. LAGODIENKO & H. DICKINSON, 2004. *VAAMANA* - a BEL1-like homeodomain protein, interacts with KNOX proteins BP and STM and regulates inflorescence stem growth in *Arabidopsis*. *Gene* **328**: 103-111.
- BOWERS, J. E., B. A. CHAPMAN, J. K. RONG & A. H. PATERSON, 2003. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* **422**: 433-438.
- BOWMAN, J. L., H. BRUGGEMANN, J. Y. LEE & K. MUMMENHOFF, 1999. Evolutionary changes in floral structure within *Lepidium* L. (Brassicaceae). *International Journal of Plant Sciences* **160**: 917-929.
- BOWMAN, J. L., D. R. SMYTH & E. M. MEYEROWITZ, 1991. Genetic Interactions among Floral Homeotic Genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**: 1-20.
- BRADLEY, D., R. CARPENTER, H. SOMMER, N. HARTLEY & E. COEN, 1993. Complementary Floral Homeotic Phenotypes from Opposite Orientations of a Transposon at the *plena* Locus of *Antirrhinum*. *Cell* **72**: 85-95.
- BREMER, B. & O. ERIKSSON, 1992. Evolution of Fruit Characters and Dispersal Modes in the Tropical Family Rubiaceae. *Biological Journal of the Linnean Society* **47**: 79-95.
- BUCK, M. J. & W. R. ATCHLEY, 2003. Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. *Journal of Molecular Evolution* **56**: 742-750.
- BÜRGLIN, T. R., 1997. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research* **25**: 4173-4180.
- BUSCH, M. A., K. BOMBLIES & D. WEIGEL, 1999. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 585-587.
- BYRNE, M. E., A. T. GROOVER, J. R. FONTANA & R. A. MARTIENSSSEN, 2003. Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the *Arabidopsis* homeobox gene *BELLRINGER*. *Development* **130**: 3941-3950.
- CAMPANELLA, J. J., L. BITINCKA & J. SMALLEY, 2003. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* **4**.

- CAUSIER, B., R. CASTILLO, J. L. ZHOU, R. INGRAM, Y. B. XUE, Z. SCHWARZ-SOMMER & B. DAVIES, 2005. Evolution in action: Following function in duplicated floral homeotic genes. *Current Biology* **15**: 1508-1512.
- CHANDLER, J., L. CORBESIER, P. SPIELMANN, J. DETTENDORFER, D. STAHL, K. APEL & S. MELZER, 2005. Modulating flowering time and prevention of pod shatter in oilseed rape. *Molecular Breeding* **15**: 87-94.
- CHOU, P. Y. & G. D. FASMAN, 1974. Conformational Parameters for Amino-Acids in Helical, Beta-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. *Biochemistry* **13**: 211-222.
- CLAUSING, G., K. MEYER & S. S. RENNER, 2000. Correlations among fruit traits and evolution of different fruits within Melastomataceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **133**: 303-326.
- COEN, E. S. & E. M. MEYEROWITZ, 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**: 31-37.
- COFFIN, J. M., S. H. HUGHES & H. E. VARMUS, 1997. The Place of Retroviruses in Biology. . In: *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- COLE, M., C. NOLTE & W. WERR, 2006. Nuclear import of the transcription factor *SHOOT MERISTEMLESS* depends on heterodimerization with BLH proteins expressed in discrete sub-domains of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **34**: 1281-1292.
- COLOMBO, M., V. BRAMBILLA, R. MARCHESELLI, E. CAPORALI, M. M. KATER & L. COLOMBO, 2010. A new role for the *SHATTERPROOF* genes during *Arabidopsis* gynoecium development. *Developmental Biology* **337**: 294-302.
- COUSENS, R. D., K. R. YOUNG & A. TADAYYON, 2010. The role of the persistent fruit wall in seed water regulation in *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *Annals of Botany* **105**: 101-108.
- COUVREUR, T. L. P., A. FRANZKE, I. A. AL-SHEHBAZ, F. T. BAKKER, M. A. KOCH & K. MUMMENHOFF, 2010. Molecular Phylogenetics, Temporal Diversification, and Principles of Evolution in the Mustard Family (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* **27**: 55-71.
- CZECHOWSKI, T., M. STITT, T. ALTMANN, M. K. UDVARDI & W. R. SCHEIBLE, 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**: 5-17.
- DE CLAVIJO, E. R., 1994. Heterocarpy and Seed Polymorphism in *Ceratocarpus heterocarpa* (Fumariaceae). *International Journal of Plant Sciences* **155**: 196-202.
- DE CLAVIJO, E. R., 2005. The reproductive strategies of the heterocarpic annual *Calendula arvensis* (Asteraceae). *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **28**: 119-126.
- DIERSCHKE, T., T. MANDAKOVA, M. A. LYSAK & K. MUMMENHOFF, 2009. A bicontinental origin of polyploid Australian/New Zealand *Lepidium* species (Brassicaceae)? Evidence from genomic in situ hybridization. *Annals of Botany* **104**: 681-688.
- DINNENY, J. R., D. WEIGEL & M. F. YANOFSKY, 2005. A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**: 4687-4696.
- DINNENY, J. R. & M. F. YANOFSKY, 2005. Drawing lines and borders: how the dehiscent fruit of *Arabidopsis* is patterned. *Bioessays* **27**: 42-49.
- DOYLE, J. J., 1994. Evolution of a Plant Homeotic Multigene Family - Toward connecting Molecular Systematics and Molecular Developmental Genetics. *Systematic Biology* **43**: 307-328.

- DOYLE, J. J. & J. L. DOYLE, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America* **19**: 5.
- DREWS, G. N., J. L. BOWMAN & E. M. MEYEROWITZ, 1991. Negative Regulation of the *Arabidopsis* Homeotic Gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* Product. *Cell* **65**: 991-1002.
- ELLENBERGER, T., D. FASS, M. ARNAUD & S. C. HARRISON, 1994. Crystal-Structure of Transcription Factor E47 - E-Boy Recognition by a Basic Region Helix-Loop-Helix Dimer. *Genes & Development* **8**: 970-980.
- ELLING, B., 2008. Verwilderter Raps im Osnabrücker Land. Erfassung, Charakterisierung & Auskreuzungspotenzial. Dissertation Universität Osnabrück.
- ELLING, B., M. HOCHKIRCH, B. NEUFFER & W. BLEEKER, 2010. Hybridisation between oilseed rape (*Brassica napus*) and tetraploid *Brassica rapa* under field conditions. *Flora* **205**: 411-417.
- ELLNER, S. & A. SHMIDA, 1981. Why are Adaptations for Long-Range Seed Dispersal Rare in Desert Plants? *Oecologia* **51**: 133-144.
- ENDRESS, P. K., 1992. Evolution and floral diversity - The phylogenetic surroundings of *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *International Journal of Plant Sciences* **153**: S106-S122.
- ERMOLAEVA, M. D., M. WU, J. A. EISEN & S. L. SALZBERG, 2003. The age of the *Arabidopsis thaliana* genome duplication. *Plant Molecular Biology* **51**: 859-866.
- FAJARDO, D. & D. M. SPOONER, 2011. Phylogenetic Relationships of *Solanum* Series *Conicibaccata* and Related Species in *Solanum* Section *Petota* Inferred from Five Conserved Ortholog Sequences. *Systematic Botany* **36**: 163-170.
- FAWCETT, J. A., S. MAERE & Y. VAN DE PEER, 2009. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 5737-5742.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach using the Bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- FERRANDIZ, C., 2002. Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2031-2038.
- FERRANDIZ, C., S. J. LILJEGREN & M. F. YANOFSKY, 2000. Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science* **289**: 436-438.
- FERRANDIZ, C., S. PELAZ & M. F. YANOFSKY, 1999. Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Review of Biochemistry* **68**: 321-354.
- FERRÉ-D'AMARÉ, A. R., P. POGNONEC, R. G. ROEDER & S. K. BURLEY, 1994. Structure and Function of the B/HLH/Z Domain of USF. *The EMBO Journal* **13**: 180-189.
- FERRÉ-D'AMARÉ, A. R., G. C. PRENDERGAST, E. B. ZIFF & S. K. BURLEY, 1993. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z Domain. *Nature* **363**: 38-45.
- FINCH-SAVAGE, W. E. & G. LEUBNER-METZGER, 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**: 501-523.
- FITCH, W. M., 1970. Distinguishing Homologous from Analogous Proteins. *Systematic Zoology* **19**: 99-&.

- FLANAGAN, C. A., Y. HU & H. MA, 1996. Specific expression of the *AGL1* MADS-box gene suggests regulatory functions in *Arabidopsis* gynoecium and ovule development. *Plant Journal* **10**: 343-353.
- FOBIS-LOISY, I., C. MIEGE & T. GAUDE, 2004. Molecular evolution of the S locus controlling mating in the Brassicaceae. *Plant Biology* **6**: 109-118.
- FRANCIS, A. & S. I. WARWICK, 2008. The biology of Canadian weeds. 3. *Lepidium draba* L., *L. chalepense* L., *L. appelianum* Al-Shehbaz (updated). *Canadian Journal of Plant Science* **88**: 379-401.
- FRANKS, R. G., C. X. WANG, J. Z. LEVIN & Z. C. LIU, 2002. SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development* **129**: 253-263.
- FRANZKE, A., D. GERMAN, I. A. AL-SHEHBAB & K. MUMMENHOFF, 2009. *Arabidopsis* family ties: molecular phylogeny and age estimates in Brassicaceae. *Taxon* **58**: 425-437.
- FRANZKE, A., M. A. LYSAK, I. A. AL-SHEHBAB, M. A. KOCH & K. MUMMENHOFF, 2011. Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science*.
- GALLOWAY, G. L., R. L. MALMBERG & R. A. PRICE, 1998. Phylogenetic utility of the nuclear gene arginine decarboxylase: An example from Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution* **15**: 1312-1320.
- GEHRING, W., 1987. Homeo boxes in the study of development. *Science* **236**: 1245-1252.
- GEHRING, W. J., M. MULLER, M. AFFOLTER, A. PERCIVALSMITH, M. BILLETER, Y. Q. QIAN, G. OTTING & K. WUTHRICH, 1990. The structure of the Homeodomain and its functional implications. *Trends in Genetics* **6**: 323-329.
- GIRIN, T., P. STEPHENSON, C. M. P. GOLDSACK, S. A. KEMPIN, A. PEREZ, N. PIRES, P. A. SPARROW, T. A. WOOD, M. F. YANOFSKY & L. OSTERGAARD, 2010. Brassicaceae *INDEHISCENT* genes specify valve margin cell fate and repress replum formation. *Plant Journal* **63**: 329-338.
- GOUY, M., S. GUINDON & O. GASCUEL, 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 221-224.
- GRAF ZU SOLMS-LAUBACH, H., 1901. Cruciferenstudien. In: H. Graf zu Solms-Laubach und F. Oltmanns (eds.). *Botanische Zeitung*, Neunundfünfzigster Jahrgang 1901, Verlag von Arthur Felix.
- GRUBERT, M., 1974. Studies on the distribution of myxospermy among seeds and fruits of Angiospermae and its ecological importance. *Acta Biologica Venezuelica* **8**: 315-551.
- GU, Q., C. FERRANDIZ, M. F. YANOFSKY & R. MARTIENSSSEN, 1998. The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**: 1509-1517.
- GUTTERMAN, Y., 1993. *Seed Germination in Desert Plants. Adaptation of Desert Organisms*. Springer Verlag, Berlin.
- GUTTERMAN, Y., 2002. *Adaptation of Desert Organisms*. Springer-Verlag, Berlin.
- GUTTERMAN, Y. & S. SHEM-TOV, 1997a. The efficiency of the strategy of mucilaginous seeds of some common annuals of the Negev adhering to the soil crust to delay collection by ants. *Israel Journal of Plant Sciences* **45**: 317-327.
- GUTTERMAN, Y. & S. SHEM-TOV, 1997b. Mucilaginous seed coat structure of *Carrichtera annua* and *Anastatica hierochuntica* from the Negev Desert

- highlands of Israel, and its adhesion to the soil crust. *Journal of Arid Environments* **35**: 695-705.
- HALL, J. C., K. J. SYTSMA & H. H. ILTIS, 2002. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. *American Journal of Botany* **89**: 1826-1842.
- HALL, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- HANSEN, L. B., H. R. SIEGISMUND & R. B. JORGENSEN, 2001. Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative B-*rapa* L. in a natural population. *Genetic Resources and Crop Evolution* **48**: 621-627.
- HANSEN, L. B., H. R. SIEGISMUND & R. B. JORGENSEN, 2003. Progressive introgression between *Brassica napus* (oilseed rape) and B-*rapa*. *Heredity* **91**: 276-283.
- HAYEK, A., 1911. Entwurf eines Cruciferen-Systems auf phylogenetischer Grundlage. *Beih. Bot. Centralbl.* **27**: 127-335.
- HEIM, M. A., M. JAKOBY, M. WERBER, C. MARTIN, B. WEISSHAAR & P. C. BAILEY, 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 735-747.
- HENRY, Y., M. BEDHOMME & G. BLANC, 2006. History, protohistory and prehistory of the *Arabidopsis thaliana* chromosome complement. *Trends in Plant Science* **11**: 267-273.
- HENSCHEL, K., R. KOFUJI, M. HASEBE, H. SAEDLER, T. MUNSTER & G. THEIBEN, 2002. Two ancient classes of MIKC-type MADS-box genes are present in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 801-814.
- HENSEN, I., 1999. Life strategies in a semi-arid grassland community - Mechanisms of dispersal and reproduction within *Lapiedro martinezii*-*Stipetum tenacissimae* (Southeastern Spain). *Feddes Repertorium* **110**: 265-285.
- HILLIS, D. M. & J. J. BULL, 1993. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology* **42**: 182-192.
- HONG, R. L., L. HAMAGUCHI, M. A. BUSCH & D. WEIGEL, 2003. Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *Plant Cell* **15**: 1296-1309.
- HONMA, T. & K. GOTO, 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**: 525-529.
- HUANG, H., M. TUDOR, T. SU, Y. ZHANG, Y. HU & H. MA, 1996. DNA Binding Properties of Two *Arabidopsis* MADS Domain Proteins: Binding Consensus and Dimer Formation. *Plant Cell* **8**: 81-94.
- IMBERT, E., 2002. Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* **5**: 13-36.
- JUKES, T. H. & C. R. CANTOR, 1969. Evolution of protein molecules. In: H.N. Munro (ed.). *Mammalian Protein Metabolism*: 21-123. Academic Press, New York.
- KACHROO, A., M. E. NASRALLAH & J. B. NASRALLAH, 2002. Self-incompatibility in the Brassicaceae: Receptor-ligand signaling and cell-to-cell communication. *Plant Cell* **14**: S227-S238.
- KANRAR, S., O. ONGUKA & H. M. S. SMITH, 2006. *Arabidopsis* inflorescence architecture requires the activities of *KNOX-BELL* homeodomain heterodimers. *Planta* **224**: 1163-1173.

- KAUFMANN, K., R. MELZER & G. THEIBEN, 2005. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* **347**: 183-198.
- KAY, K. M., J. B. WHITTALL & S. A. HODGES, 2006. A survey of nuclear ribosomal internal transcribed spacer substitution rates across angiosperms: an approximate molecular clock with life history effects. *BMC Evolutionary Biology* **6**.
- KERSTETTER, R., E. VOLLBRECHT, B. LOWE, B. VEIT, J. YAMAGUCHI & S. HAKE, 1994. Sequence-Analysis and Expression Patterns divide the Maize *KNOTTED1*-like Homeobox Genes into 2 Classes. *Plant Cell* **6**: 1877-1887.
- KHOSRAVI, A. R., S. MOHSENZADEH & K. MUMMENHOFF, 2008a. Analysis of the phylogenetic position of *Acanthocardium erinaceum* (Brassicaceae) based on ITS-sequences shows that it should be transferred to *Aethionema* as *A. erinaceum*. *Nordic Journal of Botany* **26**: 25-30.
- KHOSRAVI, A. R., S. MOHSENZADEH & K. MUMMENHOFF, 2008b. Phylogenetic position of *Brossardia papyracea* (Brassicaceae) based on sequences of nuclear ribosomal DNA. *Feddes Repertorium* **119**: 13-23.
- KHOSRAVI, A. R., S. MOHSENZADEH & K. MUMMENHOFF, 2009. Phylogenetic relationships of Old World Brassicaceae from Iran based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* **37**: 106-115.
- KIMURA, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- KISSINGER, C. R., B. S. LIU, E. MARTINBLANCO, T. B. KORNBERG & C. O. PABO, 1990. Crystal-Structure of an Engrailed Homeodomain-DNA Complex at 2.8-Å Resolution - A Framework for understanding homeodomain-DNA Interactions. *Cell* **63**: 579-590.
- KNOOP, V. & K. MÜLLER, 2006. Gene und Stammbäume - Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- KOCH, M., B. HAUBOLD & T. MITCHELL-OLDS, 2001. Molecular systematics of the Brassicaceae: evidence from coding plastidic *matK* and nuclear *Chs* sequences. *American Journal of Botany* **88**: 534-544.
- KOCH, M. & K. MUMMENHOFF, 2001. *Thlaspi* s.str. (Brassicaceae) versus *Thlaspi* s.l.: morphological and anatomical characters in the light of ITS nrDNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution* **227**: 209-225.
- KOCH, M. A., B. HAUBOLD & T. MITCHELL-OLDS, 2000. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* **17**: 1483-1498.
- KOCH, M. A., R. KARL, C. KIEFER & I. A. AL-SHEHBAZ, 2010. Colonizing the American Continent: Systematics of the Genus *Arabis* in North America (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **97**: 1040-1057.
- KOLKMEYER, B., 2009. Anatomische und molekulare Untersuchungen zur Heterokarpie in *Aethionema carneum* B. Fedtsch (Brassicaceae). Bachelorarbeit, Universität Osnabrück.
- KONISHI, S., T. IZAWA, S. Y. LIN, K. EBANA, Y. FUKUTA, T. SASAKI & M. YANO, 2006. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science* **312**: 1392-1396.
- KRAMER, E. M., R. L. DORIT & V. F. IRISH, 1998. Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: Duplication and divergence within

- the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. *Genetics* **149**: 765-783.
- LARKIN, M. A., G. BLACKSHIELDS, N. P. BROWN, R. CHENNA, P. A. MCGETTIGAN, H. MCWILLIAM, F. VALENTIN, I. M. WALLACE, A. WILM, R. LOPEZ, J. D. THOMPSON, T. J. GIBSON & D. G. HIGGINS, 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- LES, D. H., 1994. Molecular Systematics and Taxonomy of Lake Cress (*Neobeckia-aquatica*, Brassicaceae), an imperiled aquatic Mustard. *Aquatic Botany* **49**: 149-165.
- LEWIS, M. W., M. E. LESLIE & S. J. LILJEGREN, 2006. Plant separation: 50 ways to leave your mother. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 59-65.
- LILJEGREN, S. J., G. S. DITTA, H. Y. ESHED, B. SAVIDGE, J. L. BOWMAN & M. F. YANOFSKY, 2000. *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**: 766-770.
- LILJEGREN, S. J., A. H. K. ROEDER, S. A. KEMPIN, K. GREMSKI, L. OSTERGAARD, S. GUIMIL, D. K. REYES & M. F. YANOFSKY, 2004. Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell* **116**: 843-853.
- LINCOLN, C., J. LONG, J. YAMAGUCHI, K. SERIKAWA & S. HAKE, 1994. A *KNOTTED1*-like Homeobox Gene in *Arabidopsis* is Expressed in the Vegetative Meristem and Dramatically alters Leaf Morphology when Overexpressed in Transgenic Plants. *Plant Cell* **6**: 1859-1876.
- LITTLEWOOD, T. & G. I. EVAN, 1998. Helix-Loop-Helix Transcription Factors, 3rd ed. (New York: Oxford University Press).
- LIU, Z. C. & E. M. MEYEROWITZ, 1995. *LEUNIG* regulates *AGAMOUS* Expression in *Arabidopsis* Flowers. *Development* **121**: 975-991.
- LÖFFLER, G., P. C. HEINRICH & P. E. PETRIDES, 2006. Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag, Heidelberg.
- LOHMANN, J. U., R. L. HONG, M. HOBE, M. A. BUSCH, F. PARCY, R. SIMON & D. WEIGEL, 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**: 793-803.
- LU, J. J., D. Y. TAN, J. M. BASKIN & C. C. BASKIN, 2010. Fruit and seed heteromorphism in the cold desert annual ephemeral *Diptychocarpus strictus* (Brassicaceae) and possible adaptive significance. *Annals of Botany* **105**: 999-1014.
- LUDWIG, S. R., L. F. HABERA, S. L. DELLAPORTA & S. R. WESSLER, 1989. *Lc*, a Member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the *myc*-homology region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 7092-7096.
- MA, H., M. F. YANOFSKY & E. M. MEYEROWITZ, 1991. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* Gene Family with Similarity to Floral Homeotic and Transcription Factor Genes. *Genes & Development* **5**: 484-495.
- MACLEOD, J., 1981. Harvesting. In: *Oilseed Rape Book*. pp. 107-119. Cambridge Agricultural Publishing, Cambridge.
- MANDAK, B. & S. HOLMANOVA, 2004. The effect of fruit age on seed germinability of a heterocarpic species, *Atriplex sagittata*. *Plant Biology* **6**: 715-720.
- MANDEL, M. A. & M. F. YANOFSKY, 1995. The *Arabidopsis AGL8* MADS Box Gene is Expressed in Inflorescence Meristems and is Negatively Regulated by *Apetalal*. *Plant Cell* **7**: 1763-1771.

- MASSARI, M. E. & C. MURRE, 2000. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 429-440.
- MEAKIN, P. J. & J. A. ROBERTS, 1990a. Dehiscence of Fruit in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) 1. Anatomy of Pod Dehiscence. *Journal of Experimental Botany* **41**: 995-1002.
- MEAKIN, P. J. & J. A. ROBERTS, 1990b. Dehiscence of Fruit in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) 2. The Role of Cell Wall Degrading Enzymes and Ethylene. *Journal of Experimental Botany* **41**: 1003-1011.
- MELZER, R., Y. Q. WANG & G. THEIBEN, 2010. The naked and the dead: The ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**: 118-128.
- MEYEROWITZ, E. M., J. L. BOWMAN, L. L. BROCKMAN, G. N. DREWS, T. JACK, L. E. SIEBURTH & D. WEIGEL, 1991. A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development (Supplement)* **1**: 157-167.
- MOORE, R. C., S. R. GRANT & M. D. PURUGGANAN, 2005. Molecular population genetics of redundant floral-regulatory genes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 91-103.
- MÜHLHAUSEN, A., T. LENSER, S. ZACHGO, A. BUSCH, K. MUMMENHOFF & G. THEIBEN, 2011. Evidence that a transition from dehiscent to indehiscent fruits in *Lepidium* (Brassicaceae) was caused by a change upstream of *ALCATRAZ*, *INDEHISCENT* and *SHATTERPOOF* in the developmental cascade leading to fruit valve margin identity. In preparation.
- MÜHLHAUSEN, A., A. POLSTER, G. THEIBEN & K. MUMMENHOFF, 2008. Evolution of Fruit Dehiscence in Brassicaceae – Examples from *Aethionema* and *Lepidium*. In: M. Hansen (ed). Proc. V<sup>th</sup> IS on Brassicas & XVI<sup>th</sup> Crucifer Genetics WS, Acta Hort. 867, ISHS 2010.
- MULLIGAN, G. A., 2002. Weedy introduced mustards (Brassicaceae) of Canada. *Canadian Field-Naturalist* **116**: 623-631.
- MULLIGAN, G. A. & J. N. FINDLAY, 1974. Biology of Canadian Weeds. 3. *Cardaria draba*, *C. chalepensis*, and *C. pubescens*. *Canadian Journal of Plant Science* **54**: 149-160.
- MUMMENHOFF, K., I. A. AL-SHEHBAZ, F. T. BAKKER, H. P. LINDER & A. MÜHLHAUSEN, 2005. Phylogeny, morphological evolution, and speciation of endemic Brassicaceae genera in the Cape Flora of southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **92**: 400-424.
- MUMMENHOFF, K., H. BRUGGEMANN & J. L. BOWMAN, 2001a. Chloroplast DNA phylogeny and biogeography of *Lepidium* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **88**: 2051-2063.
- MUMMENHOFF, K., U. COJA & H. BRUGGEMANN, 2001b. *Pachyphragma* and *Gagria* (Brassicaceae) revisited: Molecular data indicate close relationship to *Thlaspi* s. str. *Folia Geobotanica* **36**: 293-302.
- MUMMENHOFF, K. & A. FRANZKE, 2007. Gone with the bird: late Tertiary and Quaternary intercontinental long-distance dispersal and allopolyploidization in plants. *Systematics and Biodiversity* **5**: 255-260.
- MUMMENHOFF, K., H. HURKA & H. J. BANDELT, 1992. Systematics of Australian *Lepidium* species (Brassicaceae) and implications for their origin: evidence from IEF analysis of Rubisco. *Plant Systematics and Evolution* **183**: 99-112.
- MUMMENHOFF, K., P. LINDER, N. FRIESEN, J. L. BOWMAN, J. Y. LEE & A. FRANZKE, 2004. Molecular evidence for bicontinental hybridogenous genomic

- constitution in *Lepidium* sensu stricto (Brassicaceae) species from Australia and New Zealand. *American Journal of Botany* **91**: 254-261.
- MUMMENHOFF, K., A. POLSTER, A. MÜHLHAUSEN & G. THEIBEN, 2009. *Lepidium* as a model system for studying the evolution of fruit development in Brassicaceae, pp. 1503-1513. Oxford Univ Press.
- MURRE, C., G. BAIN, M. A. VANDIJK, I. ENGEL, B. A. FURNARI, M. E. MASSARI, J. R. MATTHEWS, M. W. QUONG, R. R. RIVERA & M. H. STUIVER, 1994. Structure and Function of Helix-Loop-Helix Proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* **1218**: 129-135.
- MURRE, C., P. S. MCCAW & D. BALTIMORE, 1989. A New DNA-Binding and Dimerization Motif in Immunoglobulin Enhancer Binding, *daughterless*, *myoD*, and *myc* proteins. *Cell* **56**: 777-783.
- NASRALLAH, J. B., 2000. Cell-cell signaling in the self-incompatibility response. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 368-373.
- NAYA, F. J., C. M. M. STELLRECHT & M. J. TSAI, 1995. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes & Development* **9**: 1009-1019.
- NI, M., J. M. TEPPERMAN & P. H. QUAIL, 1998. *PIF3*, a Phytochrome-Interacting Factor Necessary for Normal Photoinduced Signal Transduction, Is a Novel Basic Helix-Loop-Helix Protein. *Cell* **95**: 657-667.
- NICOT, N., J. F. HAUSMAN, L. HOFFMANN & D. EVERS, 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2907-2914.
- NYLANDER, J. A. A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- OGAWA, M., P. KAY, S. WILSON & S. M. SWAIN, 2009. *Arabidopsis* Dehiscence Zone Polygalacturonase1 (*ADPG1*), *ADPG2*, and *QUARTET2* Are Polygalacturonases Required for Cell Separation during Reproductive Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 216-233.
- OSTERGAARD, L., S. A. KEMPIN, D. BIES, H. J. KLEE & M. F. YANOFSKY, 2006. Pod shatter-resistant *Brassica* fruit produced by ectopic expression of the *FRUITFULL* gene. *Plant Biotechnology Journal* **4**: 45-51.
- OTTING, G., Y. Q. QIAN, M. BILLETER, M. MULLER, M. AFFOLTER, W. J. GEHRING & K. WUTHRICH, 1990. Protein DNA Contacts in the Structure of a Homeodomain DNA Complex Determined by Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy in Solution. *The EMBO Journal* **9**: 3085-3092.
- PATTERSON, T. B. & T. J. GIVNISH, 2002. Phylogeny, concerted convergence, and phylogenetic niche conservatism in the core Liliales: Insights from *rbcL* and *ndhF* sequence data. *Evolution* **56**: 233-252.
- PAYNE, C. T., F. ZHANG & A. M. LLOYD, 2000. GL3 Encodes a bHLH Protein That Regulates Trichome Development in *Arabidopsis* Through Interaction With GL1 and TTG1. *Genetics* **156**: 1349-1362.
- PELEMAN, J., W. BOERJAN, G. ENGLER, J. SEURINCK, J. BOTTERMAN, T. ALLIOTTE, M. VANMONTAGU & D. INZE, 1989. Strong Cellular Preference in the Expression of a Housekeeping Gene of *Arabidopsis thaliana* Encoding S-Adenosylmethionine Synthetase. *Plant Cell* **1**: 81-93.
- PILLANS, B. & T. NAISH, 2004. Defining the quaternary. *Quaternary Science Reviews* **23**: 2271-2282.
- PINYOPICH, A., G. S. DITTA, B. SAVIDGE, S. J. LILJEGREN, E. BAUMANN, E. WISMAN & M. F. YANOFSKY, 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**: 85-88.

- POLSTER, A., 2005. The role of lignification patterns in dehiscent and indehiscent fruits in Brassicaceae: a comparative anatomical approach. Master's thesis, Universität Osnabrück.
- POSADA, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253-1256.
- PRANTL, K., 1891. Cruciferae. In A. Engler and K. Prantl (eds.). *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, Volume III, part 2, 145–206. Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- PRICE, J. S., R. N. HOBSON, M. A. NEALE & D. M. BRUCE, 1996. Seed losses in commercial harvesting of oilseed rape. *Journal of Agricultural Engineering Research* **65**: 183-191.
- PTITSYN, O. B. & A. V. FINKELSTEIN, 1983. Theory of Protein Secondary Structure and Algorithm of its Prediction. *Biopolymers* **22**: 15-25.
- PURUGGANAN, M. D., S. D. ROUNSLEY, R. J. SCHMIDT & M. F. YANOFSKY, 1995. Molecular Evolution of Flower Development - Diversification of the Plant MADS-Box Regulatory Gene Family. *Genetics* **140**: 345-356.
- QIAN, Y. Q., M. BILLETER, G. OTTING, M. MULLER, W. J. GEHRING & K. WUTHRICH, 1989. The structure of the Antennapedia Homeodomain Determined by NMR-Spectroscopy in Solutino - Comparison With Prokaryotic Repressors. *Cell* **59**: 573-580.
- RAJANI, S. & V. SUNDARESAN, 2001. The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology* **11**: 1914-1922.
- RAY, A., K. ROBINSONBEERS, S. RAY, S. C. BAKER, J. D. LANG, D. PREUSS, S. B. MILLIGAN & C. S. GASSER, 1994. *Arabidopsis* Floral Homeotic Gene *BELL* (*BEL1*) Controls Ovule Development through Negative Regulation of *AGAMOUS* Gene (*AG*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 5761-5765.
- REISER, L., Z. MODRUSAN, L. MARGOSSIAN, A. SAMACH, N. OHAD, G. W. HAUGHN & R. L. FISCHER, 1995. The *BELL1* Gene Encodes a Homeodomain Protein Involved in Pattern-Formation in the *Arabidopsis* Ovule Primordium Cell **83**: 735-742.
- RIANO-PACHON, D. M., L. G. G. CORREA, R. TREJOS-ESPINOSA & B. MUELLER-ROEBER, 2008. Green Transcription Factors: A *Chlamydomonas* Overview. *Genetics* **179**: 31-39.
- ROBINSON, K. A., J. I. KOEPKE, M. KHARODAWALA & J. M. LOPES, 2000. A network of yeast basic helix-loop-helix interactions. *Nucleic Acids Research* **28**: 4460-4466.
- RODRIGUEZ, F., J. L. OLIVER, A. MARIN & J. R. MEDINA, 1990. The general stochastic-model of nucleotide substitutions. *Journal of Theoretical Biology* **142**: 485-501.
- ROEDER, A. H. K., C. FERRANDIZ & M. F. YANOFSKY, 2003. The role of the *REPLUMLESS* homeodomain protein in Patterning the *Arabidopsis* fruit. *Current Biology* **13**: 1630-1635.
- ROEDER, A. H. K. & M. F. YANOFSKY, 2006 Fruit Development in *Arabidopsis*, pp. 1-50 in *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists.
- RONQUIST, F. & J. P. HUELSENBECK, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- ROUNSLEY, S. D., G. S. DITTA & M. F. YANOFSKY, 1995. Diverse Roles for MADS Box Genes in *Arabidopsis* Development. *Plant Cell* **7**: 1259-1269.

- SAITOU, N. & M. NEI, 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- SANGER, F., S. NICKLEN & A. R. COULSEN, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **4**: 5463-5467.
- SAVIDGE, B., S. D. ROUNSLEY & M. F. YANOFSKY, 1995. Temporal Relationships between the Transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the Floral Organ Identity Genes. *Plant Cell* **7**: 721-733.
- SCHNEUWLY, S. & W. J. GEHRING, 1985. Homeotic transformation of thorax into head: Developmental analysis of a new *Antennapedia* allele in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **108**: 377-386.
- SCHRANZ, M. E. & T. MITCHELL-OLDS, 2006. Independent ancient polyploidy events in the sister families Brassicaceae and Cleomaceae. *Plant Cell* **18**: 1152-1165.
- SCHULZ, O. E., 1936. Cruciferen. In: A. Engler and H. Harms (eds.). *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, Band 17b. Engelmann, Leipzig.
- SCHWARZ-SOMMER, Z., I. HUE, P. HUIJSER, P. J. FLOR, R. HANSEN, F. TETENS, W. E. LONNIG, H. SAEDLER & H. SOMMER, 1992. Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *The EMBO Journal* **11**: 251-263.
- SCHWARZ-SOMMER, Z., P. HUIJSER, W. NACKEN, H. SAEDLER & H. SOMMER, 1990. Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum majus*. *Science* **250**: 931-936.
- SHORE, P. & A. D. SHARROCKS, 1995. The MADS-box family of Transcription Factors. *European Journal of Biochemistry* **229**: 1-13.
- SMITH, H. M. S., B. C. CAMPBELL & S. HAKE, 2004. Competence to respond to floral inductive signals requires the homeobox genes *PENNYWISE* and *POUND-FOOLISH*. *Current Biology* **14**: 812-817.
- SMITH, H. M. S. & S. HAKE, 2003. The interaction of two homeobox genes, *BREVIPEDICELLUS* and *PENNYWISE*, regulates internode patterning in the *Arabidopsis* inflorescence. *Plant Cell* **15**: 1717-1727.
- SMYTH, D. R., J. L. BOWMAN & E. M. MEYEROWITZ, 1990. Early Flower Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 755-767.
- SOREFAN, K., T. GIRIN, S. J. LILJEGREN, K. LJUNG, P. ROBLES, C. S. GALVAN-AMPUDIA, R. OFFRINGA, J. FRIML, M. F. YANOFSKY & L. OSTERGAARD, 2009. A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **459**: 583-U114.
- SOUTHERN, E. M., 1975. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-&.
- SPENCE, J., Y. VERCHER, P. GATES & N. HARRIS, 1996 'Pod shatter' in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*, pp. 195-203. Blackwell Science Ltd.
- STRUHL, G., 1981. A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* **292**: 635-638.
- SWOFFORD, D. L., 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TEMIN, H. M. & S. MIZUTANI, 1970. Viral RNA-dependent DNA Polymerase - RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* **226**: 1211-1213.
- THEISSEN, G., 2001. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 75-85.

- THEISSEN, G., 2002. Secret life of genes. *Nature* **415**: 741-741.
- THEISSEN, G., A. BECKER, A. DI ROSA, A. KANNO, J. T. KIM, T. MUNSTER, K. U. WINTER & H. SAEDLER, 2000. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* **42**: 115-149.
- THEISSEN, G., J. T. KIM & H. SAEDLER, 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 484-516.
- THEISSEN, G., T. MÜNSTER & K. HENSCHER, 2001. Why don't mosses flower? *New Phytologist* **150**: 1-5.
- THEISSEN, G. & H. SAEDLER, 1995. MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. *Current Opinion in Genetics & Development* **5**: 628-639.
- THEISSEN, G. & H. SAEDLER, 2001. Plant biology - Floral quartets. *Nature* **409**: 469-471.
- THELLUNG, A., 1906. Die Gattung *Lepidium* (L.) R. Br. Eine Monographische Studie. Neue Denkschriften der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft 41: 1-304.
- TOLEDO-ORTIZ, G., E. HUQ & P. H. QUAIL, 2003. The *Arabidopsis* Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *Plant Cell* **15**: 1749-1770.
- VAN DER PIJL, L., 1972 *Principles of Dispersal in higher Plants*.
- VAN RHEEDE VAN OUDTSHOORN, K. & M. W. VAN ROOYEN, 1999. *Dispersal Biology of Desert Plants*. Springer Verlag, Berlin.
- VENABLE, D. L., 2007. Bet hedging in a guild of desert annuals. *Ecology* **88**: 1086-1090.
- VENABLE, D. L. & D. A. LEVIN, 1985. Ecology of Achene Dimorphism in *Heterotheca latifolia*. 1. Achene Structure, Germination and Dispersal. *Journal of Ecology* **73**: 133-145.
- VIAENE, T., D. VEKEMANS, A. BECKER, S. MELZER & K. GEUTEN, 2010. Expression divergence of the *AGL6* MADS domain transcription factor lineage after a core eudicot duplication suggests functional diversification. *BMC Plant Biology* **10**.
- VOLBRECHT, E., B. VEIT, N. SINHA & S. HAKE, 1991. The Developmental Gene *Knotted-1* is a Member of a Maize Homeobox Gene Family. *Nature* **350**: 241-243.
- WARWICK, S. I., A. FRANCIS & I. A. AL-SHEHBAZ, 2006. Brassicaceae: Species checklist and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution* **259**: 249-258.
- WEIGEL, D. & E. M. MEYEROWITZ, 1994. The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* **78**: 203-209.
- WEST, A. G., A. D. SHARROCKS, B. E. CAUSIER & B. DAVIES, 1998. DNA binding and dimerisation determinants of *Antirrhinum majus* MADS-box transcription factors. *Nucleic Acids Research* **26**: 5277-5287.
- YANOFSKY, M. F., H. MA, J. L. BOWMAN, G. N. DREWS, K. A. FELDMANN & E. M. MEYEROWITZ, 1990. The Protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**: 35-39.
- YOUNG, J. A., R. A. EVANS & P. C. MARTINELLI, 1970. Mucilaginous coatings of weed seeds. *Proceedings of the Western Society of Weed Science* **23**: pp. 35.
- ZACHGO, S., 2002. In situ hybridization. In: P. Gillmartin and C. Bowler (eds.). *Molecular Plant Biology: A Practical Approach*. Volume 2, IRL Press at Oxford University Press: Oxford, England, UK.

- ZACHGO, S., E. D. SILVA, P. MOTTE, W. TROBNER, H. SAEDLER & Z. SCHWARZSOMMER, 1995. Functional analysis of the *Antirrhinum* floral homeotic *DEFICIENS* gene in vivo and in vitro by using a temperature-sensitive mutant. *Development* **121**: 2861-2875.
- ZHANG, L. B., H. P. COMES & J. W. KADEREIT, 2001. Phylogeny and quaternary history of the European montane/alpine endemic *Soldanella* (Primulaceae) based on ITS and AFLP variation. *American Journal of Botany* **88**: 2331-2345.
- ZHRA, M. L., K. J. SYTSMA & R. G. OLMSTEAD, 2004. Delimitation of Malagasy tribe Coleeae and implications for fruit evolution in Bignoniaceae inferred from a chloroplast DNA phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* **245**: 55-67.
- ZOBELL, O., W. FAIGL, H. SAEDLER & T. MUNSTER, 2010. MIKC\* MADS-Box Proteins: Conserved Regulators of the Gametophytic Generation of Land Plants. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 1201-1211.
- ZOHARY, M., 1937. Die verbreitungsökologischen Verhältnisse der Pflanzen Palästinas. Beihefte zum botanischen Zentralblatt **61A**: 1-155.
- ZOHARY, M., 1948. Carpological studies in Cruciferae. *Palestine Journal of Botany. Jerusalem Series* **4**: 158-165.
- ZOHARY, M. & A. FAHN, 1950. On the heterocarpy of *Aethionema*. *Palestine Journal of Botany. Jerusalem Series* **5**: 28-31.

## 7

## Anhang

## 7.1

## Verwendete Primer

Tabelle 7.1 Für die vorliegende Arbeit verwendete Primer.

<i>Genname<sup>a</sup></i>	<i>GenBank Nr.</i>	<i>Primersequenz</i>
<i>Lal18S</i>	FR728672	5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3' <sup>6</sup>
<i>Lc18S</i>	FR728673	5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3' <sup>6</sup>
<i>AecSHP2</i>	FR727241	5'-GAGAGCAGCAAGAAGATAGGG-3' <sup>1</sup> 5'-CTACAAATCGGCAAGTTACG-3' <sup>4</sup> 5'-GATAATCATATTATATCTC-3' <sup>4</sup>
<i>LaSHP1</i>	FR727229	5'-CGACGCAATGGTCTTCTCAAG-3' <sup>1</sup> 5'-GCTTCAGTGACAGAAGGAGGATTG-3' <sup>2</sup> 5'-CTCTCACACTGTTGTTGGC-3' <sup>2</sup> 5'-CGAGTGGAGAAGATAATAAGAGC-3' <sup>2</sup> 5'-GAGGTAAATAATAATAAAATAGC-3' <sup>4</sup> 5'-GAATATAATAAGTCGAATTACAG-3' <sup>4</sup> 5'-GGTACGAGATTGAATCCAG-3' <sup>5</sup> 5'-GTTGAGGGTAGAAACAAG-3' <sup>5</sup> 5'-GTCTTGTGTGATGCTGAAG-3' <sup>6</sup> 5'-CTCTCAATTGTTGAGGGTAG-3' <sup>6</sup>
<i>LcSHP1</i>	FR727235	5'-CGACGCAATGGTCTTCTCAAG-3' <sup>1</sup> 5'-GCTTCAGTGACAGAAGGAGGATTG-3' <sup>2</sup> 5'-CTCTCACACTGTTGTTGGC-3' <sup>2</sup> 5'-CGAGTGGAGAAGATAATAAGAGC-3' <sup>2</sup> 5'-GCTATAGCAGTATCTCTTCAAC-3' <sup>4</sup> 5'-GATTATTATAAAAAGCAAAACC-3' <sup>4</sup> 5'-GGTACGAGATTGAATCCAG-3' <sup>5</sup> 5'-GTTGAGGGTAGAAACAAG-3' <sup>5</sup> 5'-GTCTTGTGTGATGCTGAAG-3' <sup>6</sup> 5'-CTCTCAATTGTTGAGGGTAG-3' <sup>6</sup>
<i>LaSHP2</i>	FR727230	5'-GAGAGCAGCAAGAAGATAGGG-3' <sup>1</sup> 5'-CTCTAGTCTACCTTCGAGGTTTC-3' <sup>2</sup> 5'-GTGATGGAAGGAGGATTAACG-3' <sup>2</sup> 5'-GTGGAGAAGATGACAAGAGC-3' <sup>2</sup> 5'-GCAGCAGTTAAGTGGTGTGAG-3' <sup>4</sup> 5'-CTTATATTATTAATCTTTTAGCC-3' <sup>4</sup> 5'-CTTCAAGGAACTCAAGAAC-3' <sup>5</sup> 5'-GAAGACACACCCGACTCG-3' <sup>5</sup> 5'-CCAAGATTACTGAAAGAGC-3' <sup>6</sup> 5'-GCCTTGAATAGCTAGAAGG-3' <sup>6</sup>
<i>LcSHP2</i>	FR727236	5'-GAGAGCAGCAAGAAGATAGGG-3' <sup>1</sup> 5'-CTCTAGTCTACCTTCGAGGTTTC-3' <sup>2</sup> 5'-GTGATGGAAGGAGGATTAACG-3' <sup>2</sup> 5'-GTGGAGAAGATGACAAGAGC-3' <sup>2</sup> 5'-GTAAGAGCAGCAGTTAAGTG-3' <sup>4</sup> 5'-GCTATGCATCCAACGCGTTG-3' <sup>4</sup> 5'-CTTCAAGGAACTCAAGAAC-3' <sup>5</sup> 5'-GAAGACACACCCGACTCG-3' <sup>5</sup> 5'-CCAAGATTACTGAAAGAGC-3' <sup>6</sup> 5'-CTATGCATCCAACGCGTTG-3' <sup>6</sup>
<i>LaALC</i>	FR727234	5'-CGTCGGTGATCATCTTGC-3' <sup>5</sup> 5'-GTGGAATTGTGCATCAATG-3' <sup>5</sup> 5'-CAGACAAGGATCAATGAG-3' <sup>6</sup> 5'-YWMATAYAATAGCGAAG-3' <sup>6</sup>
<i>LcALC</i>	FR727240	5'-CGTCGGTGATCATCTTGC-3' <sup>5</sup> 5'-GTGGAATTGTGCATCAATG-3' <sup>5</sup> 5'-CAGACAAGGATCAATGAG-3' <sup>6</sup> 5'-YWMATAYAATAGCGAAG-3' <sup>6</sup>
<i>LcIND</i>	FR727239	5'-GATGCAGTACATGATTGCC-3' <sup>5</sup> 5'-CAGGGTTGGGAGTTGTGG-3' <sup>5</sup> 5'-GCTTATTCTTACGTTACGC-3' <sup>6</sup> 5'-GCTTATTCTTACGTTACGC-3' <sup>6</sup>

<i>Genname<sup>a</sup></i>	<i>GenBank Nr.</i>	<i>Primersequenz</i>
<i>LaIND</i>	FR727233	5'-GATGCAGTACATGATTGCC-3' <sup>5</sup> 5'-CAGGGTTGGGAGTTGTGG-3' <sup>5</sup> 5'-GCTTATTCTTACGTTACGC-3' <sup>6</sup> 5'-GCTTATTCTTACGTTACGC-3' <sup>6</sup>
<i>LaFUL</i>	FR727231	5'-GCTCAAGGCAAGAGTTGAGG-3' <sup>1</sup> 5'-CTTCTGAAGGGCAGATATGGATTC-3' <sup>2</sup> 5'-GATAGCAGCATCAAGCTG-3' <sup>2</sup> 5'-GATCTTCCCCCATAAAAATTC-3' <sup>2</sup> 5'-CATAATACTTTGGTCATTTTCAGG-3' <sup>4</sup> 5'-GAATCTAATGATAACTTAAGTAC-3' <sup>4</sup> 5'-GGGGGAAGATCTTGATTC-3' <sup>5</sup> 5'-GAAGCGAATTATTGTGATCC-3' <sup>5</sup> 5'-GGAATTTTATGGGGGAAGATC-3' <sup>6</sup> 5'-CTACTCATTGGTGGTCGGAC-3' <sup>6</sup>
<i>LcFUL</i>	FR727237	5'-GCTCAAGGCAAGAGTTGAGG-3' <sup>1</sup> 5'-CTTCTGAAGGGCAGATATGGATTC-3' <sup>2</sup> 5'-GATAGCAGCATCAAGCTG-3' <sup>2</sup> 5'-GATCTTCCCCCATAAAAATTC-3' <sup>2</sup> 5'-CAGGGTTGTCGTTTCTCTCTC-3' <sup>4</sup> 5'-CAATGATGAGTACAAGCCACC-3' <sup>4</sup> 5'-GGGGGAAGATCTTGATTC-3' <sup>5</sup> 5'-GAAGCGAATTATTGTGATCC-3' <sup>5</sup> 5'-GGAATTTTATGGGGGAAGATC-3' <sup>6</sup> 5'-CTACTCATTGGTGGTCGGAC-3' <sup>6</sup>
<i>LcRPL</i>	FR727238	5'-CAGGTCTCTCCAGAAATCAGG-3' <sup>1</sup> 5'-CTGCTACGTTTCGTTCTCTCCAAGAGG-3' <sup>2</sup> 5'-CCAACATATGAATCTCTTCC-3' <sup>2</sup> 5'-CTCGTGCGTTTATGAACC-3' <sup>2</sup> 5'-CCACCGAGAAATCCCATG-3' <sup>3</sup> 5'-GGAGTGGAAGCCACCTGC-3' <sup>3</sup> 5'-GAGAGAGGGAATTCGAAG-3' <sup>3</sup> 5'-ATGGCTGATGCATACGAGCC-3' <sup>4</sup> 5'-GTTTAAAAGTTTCTAAATATACAC-3' <sup>4</sup> 5'-GGTTCATAAACGCACGAG-3' <sup>5</sup> 5'-CTGACGATTTTGCCCTTCG-3' <sup>5</sup> 5'-CGCACGAGTTAGGGTTTG-3' <sup>6</sup> 5'-CCTCTGAGCAGTTGTCATG-3' <sup>6</sup>
<i>LaRPL</i>	FR727232	5'-CAGGTCTCTCCAGAAATCAGG-3' <sup>1</sup> 5'-CTGCTACGTTTCGTTCTCTCCAAGAGG-3' <sup>2</sup> 5'-CCAACATATGAATCTCTTCC-3' <sup>2</sup> 5'-CTCGTGCGTTTATGAACC-3' <sup>2</sup> 5'-CCACCGAGAAATCCCATG-3' <sup>3</sup> 5'-GGAGTGGAAGCCACCTGC-3' <sup>3</sup> 5'-GAGAGAGGGAATTCGAAG-3' <sup>3</sup> 5'-ATGGCTGATGCATACGAGCC-3' <sup>4</sup> 5'-AAATTTTGTAGTTTAAAAG-3' <sup>4</sup> 5'-GGTTCATAAACGCACGAG-3' <sup>5</sup> 5'-CTGACGATTTTGCCCTTCG-3' <sup>5</sup> 5'-CGCACGAGTTAGGGTTTG-3' <sup>6</sup> 5'-CCTCTGAGCAGTTGTCATG-3' <sup>6</sup>

a: Basierend auf phylogenetischen Analysen in der vorliegenden Arbeit

<sup>1</sup> Primer für die 3'RACE

<sup>2</sup> Primer für die 5'RACE; 1.: SP1, 2.: SP2, 3.: SP3

<sup>3</sup> Primer für zweite 5'RACE, nur *RPL*-Gene

<sup>4</sup> Primer für Vollängenklone; 1.: fwd, 2.: rev

<sup>5</sup> Primer für Southern Sonden; 1.: fwd, 2.: rev

<sup>6</sup> Primer für Northern Sonden; 1.: fwd, 2.: rev

## 7.2 Puffer und Lösungen

### Brassicaceen-Spezial Anzuchtsubstrat

Lehm : Sand : Bimskies : Kompost (1:2:2:5)

### DNA-Isolation, Gelelektrophorese

<b>2 x CTAB-Puffer</b>	100 mM Tris-HCl, pH 8.0 20 mM EDTA 1,4 M NaCl 2 % PVP (w/v) 2 % CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) (w/v)
<b>10 x TBE-Puffer</b>	890 mM Tris-HCl 890 mM Borsäure 2 mM EDTA
<b>Gel-Ladepuffer</b>	0,5 x TBE 0,25% (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol

### Puffer *in situ* Hybridisierung

<b>FAE-Fixativ</b>	2 % Formaldehyd (v/v) 5 % Essigsäure (v/v) 60 % Ethanol p.A. (v/v)
<b>Paraformaldehyd-Fixativ</b>	0,1 M Natriumphosphat-Puffer 4 % Paraformaldehyd
<b>1M Natriumphosphat-Puffer</b>	1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (68,4%) 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (31,6%)
<b>Hydrolyse-Puffer</b>	80 mM NaHCO <sub>3</sub> 120 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH 10.2
<b>20 x SSPE</b>	3 M NaCl 200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM EDTA, pH 8.0 pH 7.4 mit NaOH einstellen (~27ml 10 N NaOH / l)
<b>5 x NTE</b>	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 5 mM EDTA, pH 8.0 2,5 M NaCl
<b>50 x TE</b>	0,5 M Tris-HCl, pH 7.0 50 mM EDTA, pH 8.0
<b>Puffer 1</b>	100 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl
<b>Puffer 2</b>	100 mM Tris-HCl, pH 9.5 100 mM HCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>

<b>Detektionslösung</b>	10% PVA 0,15M NaCl 0,1M Tris-HCl, pH9.5 0,05M MgCl <sub>2</sub> 1,5 µl/ml BCIP und NBT
-------------------------	--

### Puffer Southern Blot und Hybridisierung

<b>20 x SSC</b>	0,3 M Natriumcitrat; 3 M NaCl
<b>(Prä-)Hybridisierungslösung</b>	5 x SSC 2 % Magermilchpulver (w/v) 0,1 % Laurylsarcosin (w/v) 0,2 % SDS (w/v) 200 µl Heringssperma (10 mg/ml)
<b>Waschpuffer 1</b>	2 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
<b>Waschpuffer 2</b>	0,1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
<b>Puffer 1</b>	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl
<b>Puffer 2</b>	2 % (w/v) Magermilchpulver in Puffer 1
<b>Puffer 3</b>	0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl <sub>2</sub>
<b>BCIP</b>	35 % BCIP in 100% Dimethylformamid
<b>NBT</b>	6,75 % NBT in 70% Dimethylformamid

### Pollenschlauchwachstum

<b>Anilinblau:</b>	2,3g K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> in 100 ml dH <sub>2</sub> O lösen darin 0,1g Anilinblau lösen 24 h dunkel lagern; Lösung entfärbt sich und kann verwendet werden
<b>Carnoy'sche Lösung</b>	$\frac{3}{4}$ Volumen 70% EtOH (v/v) $\frac{1}{4}$ Volumen 96% Essigsäure

### Northern Hybridisierung

<b>10 x MEN-Puffer</b>	200 mM MOPS 10 mM EDTA 50 mM Natriumacetat
<b>(Prä-)hybridisierungspuffer</b>	0,5 M Natriumphosphat pH 7.2 , 7 % (w/v) SDS
<b>Waschpuffer 1</b>	1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
<b>Waschpuffer 2</b>	0,1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS

## 7.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

### Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP (Radionukleotide)	Hartmann Analytik, Braunschweig
2-Mercaptoethanol, 99%, p.A.	Fluka, Neu-Ulm
2 x RNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Anilinblau (=Wasserblau)	Fluka, Neu-Ulm
Anti-Digoxigenin-AP, FAB fragments	Roche, Mannheim
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat)	Gerbu, Gailberg
Blocking Reagent	Roche, Mannheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA, Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
CTAB (Cetyltrimethylammonium-Bomid)	Serva, Heidelberg
Chloroform, p.A.	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Denhardt-Mix, 50 x	Roth, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
Dextran-Sulfat	Roth, Karlsruhe
DIG Labeled Control RNA	Roche, Mannheim
DIG RNA Labeling Mix, 10 x konzentriert	Roche, Mannheim
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
DNA-Ladder	
- RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
- HyperLadder™ II	Bioline, Luckenwalde
- DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled	Roche, Mannheim
- Gene-Ruler™ 100 bp Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I, recombinant, RNase-frei	Roche, Mannheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol, absolut	Berkel, Ludwigshafen
Ethanol, p.A.	Berkel, Ludwigshafen
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	Fluka, Neu-Ulm
Heringssperma	Sigma, Deisenhofen
HistoClear®	National Diagnostic, Atlanta (USA)
illustra MicroSpin® G-50 Columns	GE Healthcare, München
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Biomol, Hamburg
Isopropanol	Riedel de Haën, Seelze
Kaliumphosphat	Riedel de Haën, Seelze
Kits	
- GeneJet™ PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
- NEBlot-Kit	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
- NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
- NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
- pGEM®-T Vector System I	Promega, Mannheim
- Vektor pCR®2.1	Invitrogen, Darmstadt
Kompetente Zellen CH3-Blue	Bioline, Luckenwalde
N-Laurylsarcosin	Sigma, Deisenhofen

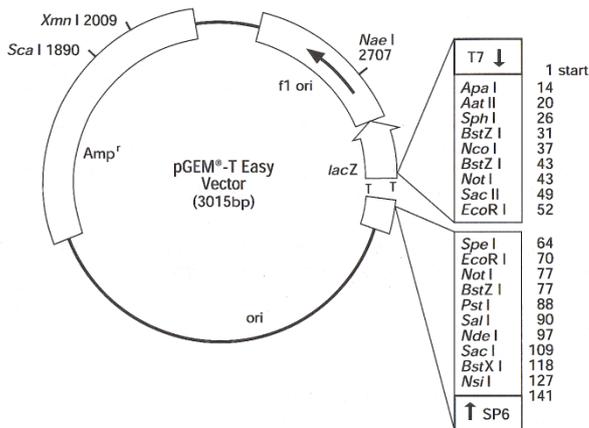
LB Agar	Roth, Karlsruhe
LB Medium (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Fluka, Neu-Ulm
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl (Kochsalz)	Roth, Karlsruhe
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Henkel, Düsseldorf
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NBT (Nitro Tetrazolium Blau)	Gerbu, Gailberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Paraplast Plus Wax	McCormick, St. Louis (USA)
PCR DIG Labeling Mix	Roche, Mannheim
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo (Finnland)
poly(A)	Roche, Mannheim
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma, Deisenhofen
Primer	Invitrogen, Darmstadt
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Fermentas, St. Leon-Rot
RNAiso-G	segenetic, Borken
RNase Away	Roth, Karlsruhe
Roti®-Histokitt II, Einschlussmedium	Roth, Karlsruhe
Seakem® LE Agarose	Lonza, Basel (Schweiz)
Seesand	Roth, Karlsruhe
SP6 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
Superfrost Ultra Plus® Objektträger	Menzel, Braunschweig
T7 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Genecraft, Köln
Terminal Desoxyribonucleotidyl Transferase	Fermentas, St. Leon-Rot
Transcriptor Reverse Transcriptase	Roche, Mannheim
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Biomol, Hamburg
tRNA	Roche, Mannheim
Tween20	Roth, Karlsruhe
X-Gal (Bromo-Chloro-Indolyl-Galaktopyranosid)	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

### Geräte und Software

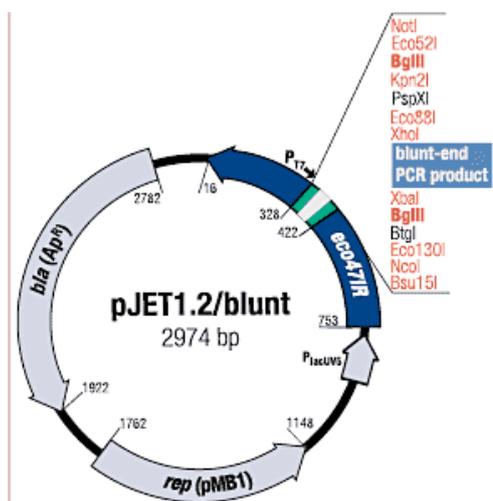
Autoklav	
- 2540 ELV	Systec, Wetzlar
- VX-100	Systec, Wetzlar
Binokular M165 FC	Leica, Wetzlar
Eisschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Eisschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer GNA-200	Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer Mini-Sub Cell GT	BioRad, Hercules (USA)
Fotodrucker UP-D897	Sony, Stuttgart
Geigerzähler LB1210 B	Berthold,
Geldokumentation MultiDoc-IT Imaging System	UVP, Upland (Kanada)
Heiztisch 12895	Medax, Rendsburg
Inkubationsschrank	
- TH10	Edmund Bühler, Hechingen

- kelvitron® B6060	Heraeus, Hanau
- Mini Hybridization Oven	Biometra, Göttingen
Kamerasysteme	
- DCF 490	Leica, Wetzlar
- Canon PowerShot G9	Canon, Krefeld
Kühlschrank Spezial-432	Philipp Kirsch, Offenbach
Mikroskope	
- M5000B	Leica, Wetzlar
- Laborlux D	Leitz, Wetzlar
- Dialux 22	Leitz, Wetzlar
Mikrotom RM2125RT	Leica, Wetzlar
NanoPhotometer	Implen, München
pH-Meter LAB 860	Schott Instruments, Mainz
Phosphorimager Storm 860	GE Healthcare, München
Reinstwasseranlage arium 611VF	Sartorius, Göttingen
Rührtisch Ikamag RH	Ika, Staufen
Schüttler	
- STR8	Omnilab, Bremen
- 3015	GFL, Burgwedel
Sequenzierungsautomat ABI377	Applied Biosystems, Darmstadt
Software	
- Doc-IT LS Image Analysis Software	UVP, Upland (Kanada)
- Leica Application Suite	Leica, Wetzlar
Spannungsgerät EPS 200	Pharmacia, Freiburg
Thermocycler	
- PTC-200	Biozym, Hessisch Oldendorf
- T3000	Biometra, Göttingen
Thermomixer MKR13	DITABIS, Pforzheim
Überkopfschüttler 3025	GFL, Burgwedel
UV-Transilluminator IL-350 M312 nm	Bachhofer, Reutigen
Vakuumblotter LKB Vacu Gene XL	Pharmacia, Freiburg
Vakuumpumpen	
- MZ 2C	Vacuubrand, Wertheim
- ME 4 NT	Vacuubrand, Wertheim
- LKB Vacu Gene pump	Pharmacia, Freiburg
Vortexer SI-0156	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Waage	
- 1601 MB8	Sartorius, Göttingen
- Kern 572	Kern, Balingen-Frommern
Wärmeschrank	
- UM400	Memmert, Schwabach
- BM300	Memmert, Schwabach
- UT6760	Thermo Scientific, Schwerte
- Vacuotherm VT6060 P	Heraeus, Hanau
Wasserbäder	
- 1002	GFL, Burgwedel
- 1052	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	
- Microfuge 35R+	Fisher Scientific, Schwerte
- Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
- Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

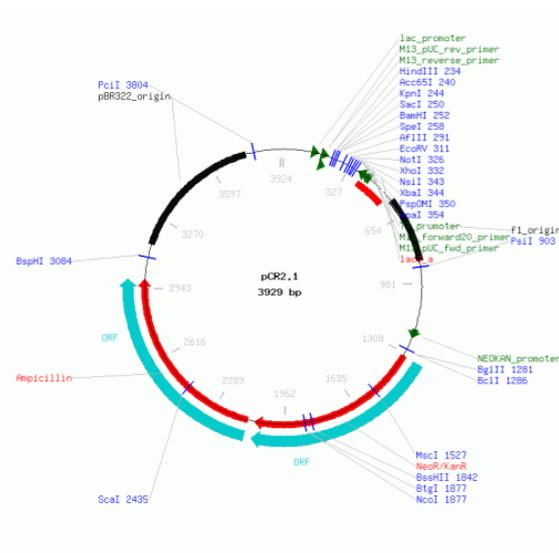
## 7.4 Vektorkarten



Vektor pGEM-T  
pGEM<sup>®</sup>-T Vector Systems;  
Promega.  
[www.promega.com](http://www.promega.com)



Vektor pJET1.2/blunt  
CloneJET<sup>™</sup> PCR Cloning Kit;  
Fermentas.  
[www.fermentas.de](http://www.fermentas.de)



Vektor pCR@2.1  
TA cloning@Kit;  
Invitrogen.  
[www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

---

## **Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Osnabrück, den 26.04.2011

---

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater apl. Prof. Dr. Klaus Mummenhoff für die Bereitstellung des Themas, eines Arbeitsplatzes im Labor sowie vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ohne Klaus hätte ich wahrscheinlich niemals mit meiner Promotion begonnen. Weiterhin danke ich Klaus für die stete Diskussionsbereitschaft.

Ich danke den lieben Kollegen der Arbeitsgruppe Spezielle Botanik / Botanik sowie den Kollegen und des Botanischen Gartens. Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei Ulrike Coja, die ich mit noch so blöden Fragen nerven konnte und die mir immer eine Hilfe war und Unterstützung bei den Unwägbarkeiten der Molekularbiologie gab.

Rudolf Grupe danke ich für wertvolle Tipps bezüglich der Pflanzenanzucht. Unerwähnt soll auch Melanie Paetsch nicht bleiben. Den so wichtigen Ausgleich erhielt ich beim Steuern des „Prinzen“ und dem Lösen ganz anderer Fragestellungen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Theißen-Labs an der Universität Jena im Sommer 2007 danke ich für die nette Aufnahmen und das geduldige Anlernen molekularbiologischer Methoden. Namentlich erwähnt seien hier Dajana Lobbes als Praxisanleiterin, Rainer Melzer als Freizeitgestalter sowie der Chef, Prof. Dr. Günter Theißen. Überdies danke ich Teresa Lenser für die Überlassung von Sequenzdaten für Southern- Northern- und *in situ* Analysen. Vielen Dank für die zwei Monate bei euch!

Andrea Busch und Sabine Zachgo danke ich für hilfreiche Tipps bei den *in situ* Hybridisierungen.

Ich danke den Arbeitsgruppen Pflanzenphysiologie und Tierphysiologie für die problemlose Mitbenutzung der Isotopenlabore sowie dem Phosphor-Imager.

Ein großer Dank geht an Christiane, Jörg, Sara, Steffi sowie meinen Vater für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Mit Eurer Hilfe konnte die Fehlerquote signifikant gesenkt werden. Außerdem danke ich Anke und Tom für die Hilfe beim Drucken.

Meinen Eltern danke ich für die moralische Unterstützung. Danke dass Ihr immer an mich geglaubt habt!

Ein besonderer Dank geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft, die die Finanzierung des Projektes sichergestellt hat.

Christiane danke ich für ihre Unterstützung und dass sie mich so sein lässt, wie ich bin.

---

## *Curriculum vitae*

### **Personalien**

Name	Andreas Mühlhausen
Geburtsdatum	07.02.1975
Geburtsort	Witzenhausen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

### **Schulbildung**

Schulform	Grundschule Pewsum
Dauer	08/1981 – 06/1985

Schulform	Orientierungsstufe Krummhörn
Dauer	08/1985 – 06/1987

Schulform	Johannes-Althusius-Gymnasium, Emden
Dauer	08/1987 – 06/1994
Abschluss	Abitur

### **Studium**

Hochschule	Universität Osnabrück
Studiengang	Biologie
Dauer	10/1994 – 06/2002
Abschluss	Diplom

### **Promotion**

Hochschule	Universität Osnabrück
Promotionsstudiengang	Biologie / Botanik
Dauer	07/2007 – 04/2011
Abschluss	Doktorgrad der Naturwissenschaften

### **Arbeitsverhältnisse**

wiss. Hilfskraft (mit/ohne Abschluss) Universität Osnabrück / Spezielle Botanik	10/2000 – 09/2006
Wissenschaftlicher Außendienst, novodirect GmbH	10/2006 – 06/2007
½ TV-L 13; DFG Projekt: Evolutionäre Entwicklungsgenetik der Fruchttöffnung in Brassicaceen	07/2007 – 06/2010
½ TV-L 13; Universitätsgesellschaft Osnabrück	07/2010 – 10/2010
½ TV-L 13; DFG Projekt: Evolutionäre Entwicklungsgenetik der Fruchttöffnung in Brassicaceen	11/2010 – 12/2010
wiss. Hilfskraft (mit Abschluss) Universität Osnabrück / Botanik	01/2011 – 02/2011

---

## Publikationen

MÜHLHAUSEN, A., POLSTER, A. MUMMENHOFF, K. THEIBEN, G. Evolution of Fruit Dehiscence in Brassicaceae – Examples from *Aethionema* and *Lepidium*. In: M. Hansen (ed). Proc. V<sup>th</sup> IS on Brassicas & XVI<sup>th</sup> Crucifer Genetics WS, Acta Hort. 867, ISHS 2010. 2008.

MUMMENHOFF K, POLSTER A, MÜHLHAUSEN A, THEIBEN G. *Lepidium* as a model system for studying the evolution of fruit development in Brassicaceae. Journal of Experimental Botany **60**: 1503-1513. 2009.

MÜHLHAUSEN, A., LENSER, T., ZACHGO, S., BUSCH, A., MUMMENHOFF, K. THEIBEN, G. Evidence that a transition from dehiscent to indehiscent fruits in *Lepidium* (Brassicaceae) was caused by a change upstream of *ALCATRAZ*, *INDEHISCENT* and *SHATTERPOOF* in the developmental cascade leading to fruit valve margin identity. In preparation. 2011

## Präsentationen und Poster

MÜHLHAUSEN, A.; MUMMENHOFF, K.; POLSTER, A., THEIBEN, G.; LENSER, T. & LOBBES, D.

Dehiscent versus indehiscent fruits – a genetic case study in the Brassicaceae. Systematics 2008, Göttingen, 7. - 11. April 2008. Vortrag.

ANDREAS MÜHLHAUSEN, A.; LENSER, T.; THEIBEN, G. & MUMMENHOFF, K.

Unequal Sisters: Evolution of Fruit Dehiscence in *Lepidium* (Brassicaceae). International PhD School PLANT DEVELOPMENT. 7. - 9. September 2009, Retzbach. Vortrag.

MUMMENHOFF, K.; MÜHLHAUSEN, A.; POLSTER, A.; LOBBES, D. & THEIBEN, G.

Comparative analysis of fruit dehiscence / indehiscence in Brassicaceae. Botanical Congress, 3. - 7. September 2007, Hamburg. Poster-Präsentation.

