

# **Beiträge zur molekularen Charakterisierung der unterschiedlichen Formen der männlichen Sterilität bei *Allium schoenoprasum* L.**

Dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte

**Dissertation**

von

Dipl.-Biol. Gieta Dewal

Geboren am 03. November 1967 in Duisburg

2001

Referent: Prof. Dr. T. Tatlioglu

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Tag der Promotion: 09.01.2001

## Kurzzusammenfassung

### Beiträge zur molekularen Charakterisierung der unterschiedlichen Formen der männlichen Sterilität bei *Allium schoenoprasum* L.

Beim Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.) sind zwei Formen der männlichen Sterilität bekannt: die cytoplasmatisch männliche Sterilität (CMS) und die genisch männliche Sterilität (GMS). Ziel der Arbeiten war es, diese durch die Suche nach einem molekularen Marker für die CMS, durch Untersuchung der mitochondrialen Translationsmuster der CMS und GMS im Vergleich zu fertilen Pflanzen und durch Arbeiten zur Isolierung des Wilau-GMS Kerngens, zu analysieren.

Zur Suche nach CMS gekoppelten molekularen Markern wurden Primerpaare von bekannten, konservierten mitochondrialen Sequenzen eingesetzt. Dabei konnte ein 900 bp-Fragment gefunden werden, das nur im (S)-Sterilitätscytoplasma der CMS 1 vorkommt. Homologievergleiche in Datenbanken zeigten, daß das 900 bp-Fragment aus unbekanntem Sequenzen, zwei Bereichen, die Ähnlichkeiten zum *atp9*-Gen haben, und einen Bereich, der homolog zum *atp6*-Gen ist, besteht. Start- und Stopkodons konnten innerhalb des Fragmentes nicht gefunden werden. Von diesem Fragment wurden Primer abgeleitet, die nach PCR-Amplifikation Banden zeigten, die nur im (S)-Sterilitätscytoplasma vorkommen, aber nicht in den anderen Cytoplasmotypen. Es wurde nachgewiesen, daß dieser Locus als Marker für die CMS 1 verwendet werden kann, da die Kerngene keinen Einfluß auf das Vorhandensein des Fragmentes haben und der Locus maternal vererbt wird. Bei der Analyse von restorierten Pflanzen mit diesem molekularen Marker zeigte sich, daß das Fragment in den sterilen und in den restorierten Individuen vorhanden war.

Bei *in organello*-Translationsstudien wurde nachgewiesen, daß ein 18 kDa Protein nur in Mitochondrien von CMS 1 Pflanzen synthetisiert wird und nicht in fertilen mit Normalcytoplasma. Damit konnten frühere Ergebnisse untermauert werden und die Vermutung, daß bei den Fertilen ebenfalls dieses Protein in einer geringeren Quantität vorkommt als bei Sterilen, nicht bestätigt werden. Auch die Mitochondrien von *St1/st1*-GMS-Pflanzen und fertile Pflanzen wurden durch *in organello*-Translationsstudien analysiert. Dabei konnte kein Unterschied in den Translationsmustern gefunden werden. Die *St1/st1*-Gene könnten aber auch einen Einfluß auf die Kerngene, die mitochondriale Proteine kodieren, haben oder direkten bzw. indirekten Einfluß auf Kerngene haben, die an der Mikrosporogenese beteiligt sind.

Mit Hilfe der „Differential Display Reverse Transcription-PCR“ (DDRT-PCR, RENDisplay) wurde versucht das *Wi/wi*-Gen, das eine weitere GMS beim Schnittlauch bedingt, zu isolieren. Beim Transkriptionsmustervergleich von sterilen und fertilen Pflanzen wurden sehr viele Polymorphismen gefunden. Einige Banden wurden zufällig ausgewählt und kloniert. Diese wurden bei RFLP-Analysen als Sonden eingesetzt, um nachzuweisen, daß die untersuchten Fragmente mit der *Wi/wi*-GMS-Sterilität gekoppelt ist. Bei den nicht radioaktiven Hybridisierungen und der anschließenden Detektion konnten nur monomorphe Bandenmuster gefunden werden.

*Schlagerwörter:* Männliche Sterilität, Molekulare Marker, *Allium schoenoprasum* L.



## Abstract

### Contribution to the molecular characterization of the different male sterility forms in *Allium schoenoprasum* L.

In chives (*Allium schoenoprasum* L.) two different forms of male sterility can be distinguished: cytoplasmic male sterility (CMS) and genic male sterility (GMS). The aim of this work was to analyse both types of sterility by finding molecular markers for the CMS, by analysis of the mitochondrial protein patterns of CMS and GMS in comparison with fertile plants, and by attempts to isolate the Wilau-GMS nuclear gene.

To find molecular markers linked to the CMS, primer pairs were constructed based on known conserved mitochondrial sequences. Via this method a primer pair was discovered that detected a 900 bp-fragment only present in the (S)-sterility cytoplasm of the CMS 1. Comparison of the fragment with sequences in databases revealed that the 900 bp-fragment was composed of unknown sequence, two areas showing homology to the *atp9*-gene, and one area showing homology to the *atp6*-gene. No translation start or stop codons were found in this sequence. From this sequence specific primers were derived which PCR-amplified fragments only present in the (S)-Cytoplasm but no other cytoplasm types. It was verified that the nuclear genes have no influence on the occurrence of the fragment, and this molecular marker is inherited maternally. This proves that this locus can be used as a molecular marker for the CMS 1. Restored plants analyzed with this marker showed that the fragments occur in sterile and restored plants.

Analysis of mitochondrial protein patterns revealed an 18 kDa protein that is only synthesized in mitochondria of CMS 1 plants, but not in fertile plants with normal cytoplasm. This is in agreement with results found earlier, however, the hypothesis of the protein being also present in fertile plants in lower amounts could not be substantiated. Comparative analysis of mitochondrial protein patterns of *St1/st1*-GMS and fertile plants did not reveal any differences. However, the *St1/st1*-genes could affect expression of nuclear genes that encode mitochondrial proteins or have direct or indirect influence on nuclear genes involved in microsporogenesis.

The *Wi/wi*-gene causes a second kind of GMS found in chives. Isolation of this gene was attempted via differential display reverse transcription-PCR (DDRT-PCR, REN-Display). Comparison of the transcription pattern of sterile and fertile plants revealed many polymorphisms. Some of these fragments were selected by random and cloned. These were used as probes in RFLP-analysis to uncover hybridizing fragment patterns linked to *Wi/wi*-GMS. Using non-radioactive hybridization and detection techniques, only monomorphic patterns were found.

*Keywords:* male sterility, molecular markers, *Allium schoenoprasum* L.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Markierung der CMS 1.....</b>	<b>8</b>
2.1	Einleitung .....	8
2.2	Material und Methoden .....	11
2.2.1	Pflanzenmaterial .....	11
2.2.2	DNA-Isolierung .....	12
2.2.3	Konstruktion verschiedener Primer und PCR-Amplifikation.....	14
2.2.4	Klonierung von PCR-Fragmenten .....	18
2.2.5	Sequenzierung der Fragmente und Datenbank-Untersuchungen .....	21
2.2.6	Konstruktion spezifischer Primer .....	21
2.3	Ergebnisse.....	23
2.3.1	Untersuchung des atp9-Gens .....	23
2.3.2	Untersuchung weiterer mitochondrialer Sequenzen zum Einsatz als molekulare CMS-Marker .....	24
2.3.3	Datenbankvergleiche .....	27
2.3.4	Untersuchung verschiedener Cytoplasmotypen mit den spezifischen Primern zur Amplifizierung von Teilstücken des CMS 1.1-900 bp-Fragmentes .....	28
2.3.5	Die CMS 1.1-Fragmente als molekulare Marker .....	29
2.3.6	Untersuchung restorierter Pflanzen mit dem CMS 1 Marker.....	35
2.4	Diskussion .....	37
<b>3</b>	<b>Untersuchung mitochondrialer Translationsmuster bei CMS und GMS im Vergleich zu fertilen Pflanzen .....</b>	<b>43</b>
3.1	Einleitung .....	43
3.2	Material und Methoden .....	46
3.2.1	Pflanzenmaterial .....	46
3.2.2	<i>In organello</i> -Translationen .....	47

3.2.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung mitochondrialer Proteine .....	50
3.3	Ergebnisse.....	53
3.3.1	Untersuchung der Translationsmuster von CMS 1 und fertilen Pflanzen.....	53
3.3.2	Untersuchung der mitochondrialen Proteine von St1/st1-GMS und fertilen Pflanzen durch <i>in organello</i> -Translationen .....	55
3.4	Diskussion .....	57
<b>4</b>	<b>Arbeiten zur Isolierung des Wilau-GMS Kerngens .....</b>	<b>62</b>
4.1	Einleitung .....	62
4.2	Material und Methoden .....	64
4.2.1	Pflanzenmaterial .....	64
4.2.2	Isolierung von RNA.....	64
4.2.3	„Differential Display Reverse Transcription“-PCR .....	65
4.2.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung .....	68
4.2.5	Reamplifikation und Klonierung polymorpher Fragmente .....	69
4.2.6	DNA-Isolierung, Restriktion und Southern Blot.....	70
4.2.7	Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismen.....	72
4.3	Ergebnisse.....	76
4.3.1	DDRT-PCR .....	76
4.3.2	RFLP-Analysen .....	79
4.4	Diskussion .....	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>85</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>87</b>



## Abkürzungsverzeichnis:

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>atp9</i>	Gen für die Untereinheit 9 der ATPase
bp	Basenpaare
Ci	Curie
CMS	cytoplasmatische männliche Sterilität
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis[ $\beta$ -Amino-Ethylether]N,N'-Tetraessigsäure
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
Mops	3-[N-Morpholino] Propan Sulfonsäure
mt	mitochondrial
<i>nad9</i>	Gen für die Untereinheit 9 der NADH-Dehydrogenase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PVP	Polyvinyl-Pyrrolidon
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Taq</i>	thermostabile DNA-Polymerase von <i>Termus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4chloro-indolyl- $\beta$ -D-Galactosid



# 1 Einleitung

In der Natur kommen grundsätzlich zwei sexuelle Fortpflanzungssysteme vor, die Fremdbefruchtung (Allogamie) und die Selbstbefruchtung (Autogamie), die in seltenen Fällen auch vermischt sind (BECKER, 1993). Bei der partiellen Fremdbefruchtung gibt es im Gegensatz zur Allogamie keinen Mechanismus, der die Selbstbefruchtung verhindert. Es kommt also immer zu einer Selbstung, deren Anteil von der genetischen Variabilität und Umwelteinflüssen abhängig ist.

Bei Allogamie dagegen gibt es verschiedene Mechanismen, die die Selbstbefruchtung verhindern. Der Vorteil von Fremdbefruchtung ist die Förderung von genetischer Variabilität und damit der Anpassungsfähigkeit einer Population. Bei der Selbstbefruchtung hingegen entsteht eine höhere genetische Homogenität, die sich auf die Verbreitung und die Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen nachteilig auswirken kann. Jedoch ermöglicht Autogamie auch Samenbildung ohne Fremdpollen an nur einer einzigen Blüte, was ein Vorteil für beispielsweise Pionierpflanzen oder Pflanzen mit sehr geringer Populationsdichte ist (ODENBACH, 1997).

Zu den Mechanismen, zur Verhinderung der Selbstung zählt die Diözie. Jedoch kommen getrenntgeschlechtliche Arten bei Blütenpflanzen eher selten vor (BECKER, 1993). Häufiger sind Arten, bei denen die männlichen und weiblichen Blütenorgane nicht gleichzeitig reifen. Bei der Proterandrie (Vormännlichkeit) sind die Antheren vor der Narbe reif, bei Proterogynie (Vorweiblichkeit) die weiblichen Blütenorgane vor den männlichen (SITTE et al., 1998). Die Vormännlichkeit ist die häufiger auftretende Form (ODENBACH, 1997).

Eine weitere Möglichkeit, die Selbstung zu erschweren ist die Selbstinkompatibilität. Hierbei wird zwischen dem homomorphen und dem heteromorphen System unterschieden. Die heteromorphe Selbstinkompatibilität weist im Gegensatz zur homomorphen im Blütenbau morphologische Unterschiede auf. Zu dem heteromorphen System gehört die Distylie und die Tristylye, die auch mit Heterostylie bezeichnet werden. Dabei werden

verschiedene Blütentypen ausgebildet, die sich in der Länge ihrer Griffel unterscheiden. Bei der Distylie gibt es zwei Blütentypen, in denen entweder ein kleiner Griffel („Thrum“) und lange Antheren oder ein langer Griffel („Pin“) und kurze Antheren ausgebildet werden. Samen entstehen nur wenn eine Befruchtung zwischen Pflanzen verschiedener Blütentypen stattfindet („Pin“ x „Thrum“ bzw. „Thrum“ x „Pin“, DE NETTANCOURT, 1977). Distylie kommt in 24 Familien und mehr als 164 Genera der Blütenpflanzen vor, von denen die bekanntesten Familien die *Primulaceae*, *Rubiaceae* und *Plumbaginaceae* sind (FRANKLIN et al., 1995). Bei der Tristylie gibt es drei Blütentypen, in denen die Griffel entweder kurz, mittel oder lang sind. Die Antheren haben immer zwei verschiedene Größen, die der Länge der Griffel entsprechen, die in diesem Blütentyp nicht vorkommen. Selbstkompatible Reaktionen sind nur zwischen Pollen und Narben möglich, deren Antheren bzw. Griffel auf der gleichen Höhe sind. Alle anderen Pollen sind inkompatibel (DE NETTANCOURT, 1977). Tristylie ist weniger verbreitet als Distylie und wurde bislang nur in den Familien *Lythraceae*, *Oxalidaceae* und *Pontederiaceae* vorgefunden (FRANKLIN et al., 1995).

Das homomorphe System wird unterteilt in die sporophytische und die gametophytische Selbstinkompatibilität. Bei der sporophytischen Selbstinkompatibilität wird der Phänotyp des Pollenkorns durch das diploide Genom des Sporophyten bestimmt. Entscheidend ist hierbei meist das S-Gen, das sehr viele Allele hat. Wenn die S-Genotypen von Pollen und Narbe übereinstimmen, kann keine Befruchtung stattfinden. Zwischen den verschiedenen S-Allelen können kodominante und/oder dominante Interaktionen bestehen, die betreffend der Kompatibilitätsreaktion den Phänotyp von Narbe und Pollen bestimmen. Die sporophytische Selbstinkompatibilität kommt zum Beispiel in der Familie der *Brassicaceae*, *Convolvulaceae*, *Betulaceae*, *Caryophyllaceae* und *Sterculiaceae* vor.

Bei der gametophytischen Selbstinkompatibilität sind ein, zwei oder mehrere Loci an der Ausprägung beteiligt. Hier bestimmt der haploide Genotyp des Pollens entscheidend über die Inkompatibilitätsreaktion bzw. die Befruchtung. Durch die Selbstinkompatibilität wird eine Selbstbestäubung und jede Befruchtung zwischen verschiedenen Pflanzen des gleichen Genotyps unterbunden. Die gametophytische Selbstinkompatibilität kommt zum

Beispiel in den Familien der (ein Locus:) *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Papaveraceae*, (zwei Loci:) *Gramineae*, (mehrere Loci:) *Ranunculaceae* und *Chenopodiaceae* vor.

Neben den vorgestellten Fremdbefruchtungsmechanismen treten in sehr vielen Pflanzenspezies Individuen auf, die keinen funktionsfähigen Pollen bilden können. Genetische Ursachen dieser Pollensterilität können die cytoplasmatisch männliche Sterilität (CMS) oder die genisch männliche Sterilität (GMS) sein.

Bei der CMS basiert die Pollensterilität auf ein zusätzliches offenes bzw. unbekanntes Leseraster (orf/urf) im mitochondrialen Genom (SCHNABEL und WISE, 1998). Das besondere an diesen orfs/urfs ist ihre chimere Sequenz, die häufig Homologien zu verschiedenen mitochondrialen Genen zeigt. Die Basenfolge ist bei den meisten Pflanzenspezies sehr unterschiedlich. Das Produkt dieses Leserasters ist meist ein zusätzliches Protein, das nur in den pollensterilen Pflanzen vorkommt und das durch den Vergleich der mitochondrialen Translationsmuster von sterilen und fertilen Pflanzen nachgewiesen werden kann. Pflanzen, die cytoplasmatisch männlich steril sind, tragen das Sterilitätscytoplasma (S). Bei vielen Pflanzen konnten Restorerogene (*Rf/rf*), die die Fertilität wiederherstellen, gefunden werden. Diese Gene sind im Zellkern lokalisiert und wirken in den meisten Fällen dominant. Auf Grund dieser Restorerogene können CMS-Cytoplasmen so lange unentdeckt in Linien vorkommen, bis die Restorerogene ausgekreuzt werden oder Mutationen zum Funktionsverlust führen, so daß keine Fertilitätsrestoration mehr erfolgen kann.

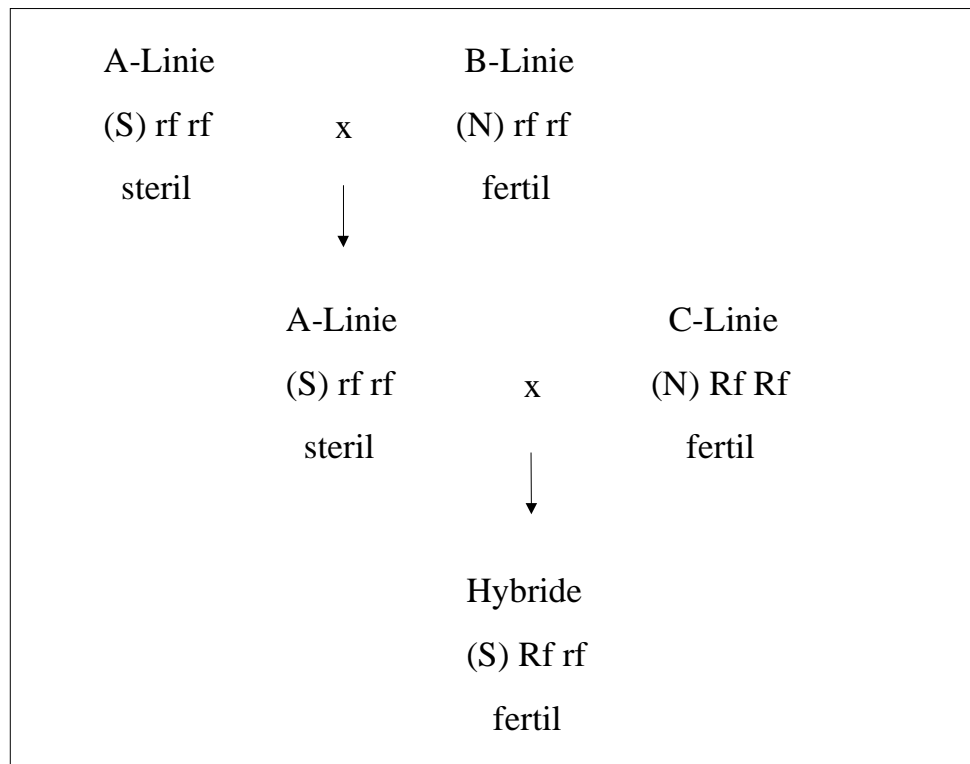
Neben dem Sterilitätscytoplasma kommt zumeist ein Normalcytoplasma (N) vor, das unabhängig von den Restorerogenen immer pollenfertile Pflanzen bedingt. Aus diesen Pflanzen können Individuen ausgelesen werden, die fertil sind, jedoch keine restorierenden Gene ((N) *rf rf*) im Zellkern haben. Diese Pflanzen können zur Vermehrung von sterilen Linien genutzt werden, indem sie mit sterilen Pflanzen ((S) *rf rf*) gekreuzt werden. Solche Individuen werden „Maintainer“ (Erhalter) genannt.

Die CMS tritt häufig nach Artkreuzungen auf. Ein Beispiel hierfür ist die Kreuzung der Kultursonnenblume *Helianthus annuus* mit *Helianthus petiolaris*, durch die die CMS in

*H. annuus* eingelagert wurde (SCHNABEL und WISE, 1998). Zudem kann CMS durch Protoplastenfusion oder interspezifische Kreuzungen entstehen oder spontan in einer Art auftreten.

Durch mikroskopische Untersuchungen konnten bei Pflanzen morphologische Veränderungen in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben festgestellt werden, die mit CMS assoziiert sind. Dazu gehören: abnormale Antherenentwicklung, Pollensäcke, die sich nicht öffnen, Störungen während unterschiedlicher Stadien der männlichen Gametenentwicklung, z. B. frühzeitiges Degenerieren des Tapetums, so daß der männliche Gametophyt nicht ernährt werden kann.

Die CMS findet praktische Anwendung in der Hybridzüchtung. Dabei wird ausgenutzt, daß bei Kreuzungen von Pflanzen, die weitgehend homozygot und genetisch verschieden sind, die Nachkommenschaft ihre Eltern an Wüchsigkeit und in den Leistungseigenschaften übertrifft und sich zudem durch Uniformität auszeichnet. Der natürliche Mechanismus der CMS ermöglicht es, bei einigen Arten männlich sterile Mutterlinien ((S) *rf rf*) herzustellen und somit arbeitsaufwendige Handkastrationen zu vermeiden. Können zudem noch Maintainerlinien ((N) *rf rf*) und Restorerlinien ((N) *Rf Rf* oder (S) *Rf Rf*) gezüchtet werden, kann die CMS zur Hybridsaatguterzeugung genutzt werden. Der Vorteil der CMS besteht darin, daß durch die Kreuzung der sterilen Mutterlinie (A-Linie) mit einer Maintainerlinie (B-Linie) eine 100 % sterile Nachkommenschaft entsteht. Dies ist auf die meist maternale Vererbung der Mitochondrien zurückzuführen, die durch Southern-Hybridisierungen mit mitochondrialen Sonden nachgewiesen werden kann. Das Sterilitätscytoplasma der Mutter wird also an jeden ihrer Nachkommen weitergegeben. Restorerlinien (C-Linien) sind vor allem dann wichtig, wenn Saatgut oder Früchte produziert werden. Wird der vegetative Teil der Pflanzen genutzt, werden diese Linien nicht benötigt. Die Restorerlinien tragen das Normal- oder Sterilitätscytoplasma und enthalten im Zellkern ein oder mehrere Restorergene meist im dominanten Zustand. In Abbildung 1.1 ist die Herstellung einer fertilen Hybridsorte dargestellt.



**Abb. 1.1:** Schema zur Herstellung von Hybridsaatgut durch die Nutzung der CMS

Beim Schnittlauch wurden zwei verschiedene cytoplasmatisch männliche Sterilitätsformen gefunden. Sie werden mit CMS 1 und CMS 2 bezeichnet. In dem Sterilitätscytoplasma (S) der CMS 1 wurde ein 18 kDa Protein gefunden, das bei fertilen Pflanzen mit (N)-Cytoplasma nicht auftritt (POTZ und TATLIOGLU, 1993). Im (S2)-Cytoplasma kommt dieses 18 kDa Protein nicht vor. Statt dessen haben diese Pflanzen zusätzlich ein 16,8 kDa Protein im Vergleich zu Pflanzen mit Normalcytoplasma (ENGELKE, 1999). Außerdem wurde ein 17,8 kDa Protein gefunden, das nur in fertilen Pflanzen vorkommt, und ein Polymorphismus im ATP9-Protein, das in den sterilen Pflanzen größer ist (4,6 kDa) als in den Individuen mit Normalcytoplasma (4,4 kDa). Zusätzlich zu den Pflanzen mit Sterilitätscytoplasmen konnten drei verschiedene Normalcytoplasmen nachgewiesen werden: (N1), (N2) und (N3). Diese unterscheiden sich bezüglich der Organisation ihrer mitochondrialen Gene (ENGELKE und TATLIOGLU, 2000a).

Im CMS 1 System wurden drei verschiedene Restorerogene gefunden. Das Gen *X/x* bedingt im dominanten Zustand die Wiederherstellung der männlichen Fertilität (TATLIOGLU, 1982). Das *A/a* Gen wirkt im rezessiven Zustand restorierend, wenn 14 Tage vor der Blüte

eine Tetracyclin-Besprühung durchgeführt wird (TATLIOGLU und WRICKE, 1988; RUGE et al., 1993). Zudem wurde das Gen *T/t* gefunden, das im dominanten Zustand eine Temperatursensitivität bewirkt. Werden diese Pflanzen bei konstant hohen Temperaturen (24 °C) kultiviert, ist die Wiederherstellung der männlichen Fertilität möglich (TATLIOGLU, 1987). Sowohl die durch Tetracyclinbehandlung als auch die durch hohe Temperatur hervorgerufene Fertilität ist reversibel (TATLIOGLU, 1985, 1986). Auch die CMS 2 kann wieder restoriert werden. Liegt das *St2/st2*-Gen im dominanten Zustand vor, werden die Pflanzen männlich fertil (ENGELKE, 1999; ENGELKE UND TATLIOGLU, 2000c).

Nicht nur die CMS führt zum Verlust der Pollenfertilität, sondern auch die genische männliche Sterilität. Hier konnte bislang durch klassisch genetische Analysen keine direkte Beteiligung der Mitochondrien am Fertilitätsverlust der Pollen nachgewiesen werden. Hingegen konnte gezeigt werden, daß meist rezessive Kerngene die GMS bedingen.

Die GMS hat im Gegensatz zur CMS den Nachteil, daß die Züchtung und Erhaltung einer männlich sterilen Mutterlinie schwierig ist: nach einer Kreuzung einer sterilen Pflanze mit einer fertilen Pflanze beträgt der prozentuale Anteil steriler Nachkommen weniger als 100 %, da in der Regel eine 1:1 Spaltung der Fertilen zu den Sterilen vorliegt. Diese Segregation ist durch die Tatsache bedingt, daß der GMS-Locus in der Mutterlinie homozygot rezessiv vorliegt, bei der Vaterlinie jedoch im günstigsten Fall heterozygot. Fertile Hybriden können durch die Kreuzung einer sterilen Pflanze mit einem am GMS-Locus homozygot dominanten Vater erzeugt werden. Obwohl die GMS im Pflanzenreich etwa vier mal häufiger vorkommt als die CMS (KAUL, 1988), ist ihre praktische Nutzung beispielsweise in der Hybridsaatgutproduktion sehr eingeschränkt. Auch über den Wirkungsort und die Wirkungsweise von GMS-Genen ist wenig bekannt.

Beim Schnittlauch sind drei Kerngene (*Wi/wi*, *St1/st1*, *St2/st2*) nachgewiesen worden, die im rezessiven Zustand zu Pollensterilität führen (TATLIOGLU, 1994). In weiteren klassisch genetischen Untersuchungen wurde analysiert, ob es sich bei diesen Genen um CMS-Restorerogene oder um GMS-Gene handelt. Es konnte gezeigt werden, daß das rezessive *st2*-Gen in Verbindung mit dem (S2)-Cytoplasma die CMS 2 bedingt und das dominante *St2*-Gen ein Restorergen ist (ENGELKE, 1999; ENGELKE UND TATLIOGLU, 2000c).



---

Außerdem wurde nachgewiesen, daß es sich bei dem *Wi/wi*- und dem *St1/st1*-Gen um GMS-Gene handelt (TATLIOGLU, 1994; ENGELKE und TATLIOGLU, 1996; ENGELKE, 1999, ENGELKE und TATLIOGLU, 2000b).

In der vorliegenden Arbeit wurde *Allium schoenoprasum* L. als Modellpflanze genutzt, da sie einige Vorteile bietet: zu den wichtigen Eigenschaften zählen die leichte vegetative Vermehrbarkeit und die Möglichkeit wichtige Pflanzen mehrere Jahre erhalten zu können. Darüber hinaus konnten zwei klar definierte CMS- sowie GMS-Systeme gefunden werden, die es ermöglichen, die beiden Formen der Pollensterilität an einer einzigen Art zu untersuchen. Dieses wurde genutzt, um einen Marker für das Sterilitätscytoplasma (S) zu finden, die mitochondrialen Translationsmuster der CMS 1 und der *St1/st1*-GMS mit verschiedenen Normalcytoplasmen zu vergleichen. Außerdem wurden grundlegende Arbeiten zur Isolierung des *Wi/wi*-GMS bedingenden Kerngens, das in der Sorte Wilau aufgetreten ist, durchgeführt.

## 2 Markierung der CMS 1

### 2.1 Einleitung

Derzeit wird in verschiedenen Pflanzen-Genomprojekten beispielsweise bei Reis, Arabidopsis und Gerste der Versuch unternommen, alle Gene der untersuchten Arten zu identifizieren. Weitere Projekte befassen sich zudem mit der Sequenzierung der mitochondrialen DNA. Nach Analyse und Identifikation dieser Gene wird es möglich sein, die Interaktion zwischen Kerngenen und den mitochondrialen besser zu verstehen. Bekannt sind inzwischen die Sequenzen des mitochondrialen Genoms des Lebermooses *Marchantia polymorpha* (ODA et al., 1992) und von *Arabidopsis thaliana* (UNSELD et al., 1997). Zudem sind zwei Chromosomen von *Arabidopsis thaliana* das Chromosom II (LIN et al., 1999) und das Chromosom IV (THE EUROPEAN UNION ARABIDOPSIS GENOME SEQUENCING CONSORTIUM & THE COLD SPRING HARBOR, WASHINGTON UNIVERSITY IN ST LOUIS AND PE BIOSYSTEMS ARABIDOPSIS SEQUENCING CONSORTIUM, 1999) vollständig sequenziert. Das mitochondriale Genom von *Arabidopsis thaliana* umfaßt 366924 bp. Es konnten 57 Gene identifiziert werden, deren Größe 10 % des mitochondrialen Genoms entspricht. Offene Leseraster größer als 100 bp repräsentieren weitere 10 % der Gesamtsequenz. 60 % des Chondrioms sind noch nicht identifiziert (UNSELD et al., 1997). Bei Homologievergleichen der Sequenz des Chromosom II von *Arabidopsis thaliana* stellte sich heraus, daß 75 % (270 kb) des mitochondrialen Genoms in der Sequenz des Chromosom II vorkommen. Dies ist die bislang größte Sequenz, die bei einem Organellen-Kern Transfer gefunden wurde. Zudem zeigen diese 270 kb 99 % Sequenzhomologie zu dem mitochondrialen Genom, so daß die Vermutung nahe liegt, daß der Transfer erst kürzlich stattgefunden hat (LIN et al., 1999).

Nach der vollständigen Sequenzierung eines Genoms werden potentielle Gene durch Homologievergleiche mit allen bereits bekannten Sequenzen aus verschiedenen Datenbanken identifiziert. Dabei werden nicht nur bekannte pflanzliche sondern auch andere prokaryotische und eukaryotische Sequenzen berücksichtigt. Durch diese Erkenntnisse ist es viel einfacher geworden, Gene von Pflanzen zu analysieren, deren

Genom noch nicht so gut untersucht ist. Mit Hilfe der bekannten pflanzlichen Sequenzen können Primer abgeleitet werden, die eine Analyse eines Gens mittels PCR ermöglichen. Dadurch können viele arbeitsaufwendige Untersuchungen ersetzt werden.

Um also die Interaktion von Kern- und mitochondrialen Genom bzw. die Inkompatibilität, die bei der CMS auftritt, besser untersuchen zu können, müssen die daran beteiligten Gene isoliert und sequenziert werden. Der erste Schritt zur Identifizierung eines sterilitätsbedingenden offenen Leserasters kann beispielsweise durch die Markierung der CMS-Sequenz erfolgen. SATHO (1998) gelang die Markierung einer CMS-Sequenz bei *Allium cepa* L., indem er zunächst Northern-Hybridisierungen mit mitochondrialen Sonden durchführte. Die dabei auftretenden sterilitäts-assoziierten Polymorphismen wurden dann durch Ableitung von geeigneten PCR-Primern aus der Sondensequenz weiter untersucht. So konnte SATHO (1998) einen Marker zur Unterscheidung des (S)- und (N)-Cytoplasmas bei der Küchenzwiebel entwickeln.

Durch physikalische Kartierung des mitochondrialen Genoms von *Brassica napus* konnte ein Unterschied zwischen den CMS-Cytoplasmen pol und cam entdeckt werden. Es fand eine Umorganisation der Region um das *atp6*-Gen statt (L'HOMME AND BROWN, 1993). Bei der Sonnenblume konnte durch RFLP-Analysen ein Marker für das sterile PET1-Cytoplasma gefunden werden. Weitere Untersuchungen ergaben, daß der orfH522 die CMS bedingt (HORN et al., 1995).

Umgekehrt kann aber auch nach der Identifikation einer CMS-Sequenz und Konstruktion geeigneter Primer diese Basenfolge als PCR-Marker zur Selektion von sterilen Pflanzen genutzt werden.

Marker finden nicht nur in der Forschung sondern unter anderem auch in der Pflanzenzüchtung Anwendung. So können z. B. aus einer Population mit Hilfe von PCR-Markern die für den Züchter interessanten Individuen im Zwei-Blatt Stadium selektiert werden bzw. Kreuzungen überprüft werden. Dies führt zur Senkung der Kosten eines Zuchtprogramms. Zudem haben DNA-Marker den Vorteil, das sie umweltunabhängig sind

im Gegensatz zu den Bonituren, die durchgeführt werden müssen, wenn keine Marker vorhanden sind.

Beim Schnittlauch wurden bei *in organello*-Translationsstudien der CMS-Systeme im (S)-Cytoplasma ein 18 kDa Protein und bei der CMS 2 ein 16,8 kDa Polypeptid gefunden, die nur bei den sterilen vorhanden sind (POTZ und TATLIOGLU, 1993, ENGELKE, 1999). Außerdem variierte die Größe des ATP9-Proteins im (S2)-Cytoplasma: bei sterilen Pflanzen beträgt das Molekulargewicht 4,6 kDa, bei fertilen Individuen nur 4,4 kDa. In Pflanzen mit Normalcytoplasma wurde darüber hinaus ein 17,8 kDa Protein gefunden, daß bei der CMS 2 fehlt (ENGELKE, 1999). Die Aminosäuresequenz des 18 kDa Proteins konnte durch Massenspektroskopie nicht ermittelt werden, da nicht genügend Polypeptid aus Polyacrylamidgelen isoliert werden konnte. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, mit molekularbiologischen Methoden eine CMS-Sequenz oder Marker für die CMS-Systeme von *Allium schoenoprasum* L. zu finden.

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 Pflanzenmaterial

Für die Suche nach molekularen Markern für das CMS verursachende Cytoplasma wurden je drei Pflanzen der verschiedenen sterilen und fertilen Cytoplasmatypen untersucht. In Tabelle 2.1 sind die Cytoplasmatypen und die Pflanzennummern aufgeführt. Um die drei Pflanzen unterscheiden zu können, werden zusätzlich zum Cytoplasmatyp verschiedene Indizes (1,2 oder 3), zugefügt.

**Tab. 2.1:** Cytoplasmabezeichnung der verschiedenen Einzelpflanzen.

<b>Cytoplasmabezeichnung</b>	<b>Pflanznummer</b>
(N1) <sub>1</sub>	11013/40
(N1) <sub>2</sub>	11013/44
(N1) <sub>3</sub>	11013/45
(N2) <sub>1</sub>	11029/17
(N2) <sub>2</sub>	11029/54
(N2) <sub>3</sub>	11029/59
(N3) <sub>1</sub>	15070/13
(N3) <sub>2</sub>	15073/5
(N3) <sub>3</sub>	15073/22
(S) <sub>1</sub>	18105/1
(S) <sub>2</sub>	18113/1
(S) <sub>3</sub>	18125/1
(S2) <sub>1</sub>	18205/1
(S2) <sub>2</sub>	18213/1
(S2) <sub>3</sub>	18219/1

Zur Untersuchung der Vererbung des molekularen Markers wurden verschiedene männlich sterile Mutterpflanzen, Maintainer und Kreuzungs- bzw. Selbstungsnachkommenschaften untersucht. Die Mutterpflanzen und Kreuzungsnachkommenschaften haben die Linienbezeichnungen 6025, 14013, 17010 und 18033, die Maintainerpflanzen und Selbstungsnachkommenschaften die Bezeichnung bzw. die Nummern Grolau, 2035, 16105, 17009 und 18035. Die genauen Abstammungs- und Verwandtschaftsverhältnisse sind in Abbildung 2.7 und 2.9 im Ergebnisteil dargestellt.

In weiteren Analysen wurden restorierte Pflanzen mit dem molekularen Marker untersucht. Dabei wurden je zwei Pflanzen, die durch das *X*-Gen oder durch das *T*-Gen restoriert wurden, und je zwei sterile, die das Restorer-gen homozygot rezessiv tragen (*x* oder *t*) verwendet. Sie sind in Tabelle 2.2 mit den in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen aufgeführt. Die jeweils zwei untersuchten Pflanzen sind mit einem Index (1 oder 2) versehen.

**Tab. 2.2:** Bezeichnung der restorierten und sterilen Pflanzen

Bezeichnung	Restorer-gen	Pflanzennummer
$_1(S)X.$	<i>X</i>	6025/26
$_2(S)X.$	<i>X</i>	6025/76
$_1(S)xx$	-	6025/21
$_2(S)xx$	-	6025/78
$_1(S)T.$	<i>T</i>	14014/2
$_2(S)T.$	<i>T</i>	14014/6
$_1(S)tt$	-	14014/1
$_2(S)tt$	-	14014/3

### 2.2.2 DNA-Isolierung

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von BENTZEN et al. (1990). Dabei wurde die DNA nach der von SAGHAI-MAROOF et al. (1984)

beschriebene CTAB-Methode extrahiert. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und in einer Schwingmühle (Fa. Retsch) gemörsert. Alle dabei genutzten Geräte wurden zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt.

Jeweils 0,2 g des gemörserten Materials sind zu 1,5 ml 1,33 %tigen CTAB-Extraktionspuffer I in ein „Serum separation tube“ (SST) gegeben und für 60 bis 90 min im Wasserbad bei 65 °C geschüttelt worden. Anschließend wurden 1,5 ml Phenol hinzugegeben, die Röhrchen 10 min bei RT geschüttelt und 15 min bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Serumtrenner, der in den SST enthalten ist, wird dabei zwischen die entstehenden zwei Phasen verlagert, so daß der Überstand in ein neues Röhrchen dekantiert werden kann. Anschließend wurde eine zweite Phenol-Extraktion durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde in das SST 1,5 ml eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) hinzugegeben, 10 min bei RT geschüttelt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die RNA wurde mittels 0,15 U RNase und 20 minütiger Inkubation bei 37 °C verdaut. Nach Zugabe von 1,5 ml Chloroform, 10 minütiger Inkubation bei RT, 15 minütiger Zentrifugation bei 3000 x g und 4 °C wurde der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Hinzufügen von 1,5 ml Isopropanol sowie von 150 µl 3 M NaAcetat, Inkubation der Proben über Nacht bei -20 °C und Zentrifugation für 15 min bei 9000 x g und 4 °C erfolgte die Sedimentation der DNA. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und abgelöst, in ein Eppendorfgefäß überspült und erneut für 15 min bei 9000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde es getrocknet und in 100 µl 1 x TE gelöst. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie durch Vergleich mit bekannten λ-DNA-Konzentrationen in einem Agarosegel.

#### **1,3 % CTAB-Extraktionspuffer I**

67 mM Tris pH 8,0  
 13,4 mM EDTA pH 8,0  
 0,93 M NaCl  
 1,33 % CTAB  
 0,67 % PVP-40

#### **1 x TE**

10 mM Tris/HCl pH 8,0  
 1 mM EDTA pH 8,0

Bei einigen Pflanzen, von denen nur wenig DNA benötigt wurde, ist eine vereinfachte DNA-Isolierungsmethode verwendet worden, die für die PCR geeignete DNA-Qualität lieferte (UPHOFF, 1994). Hierzu wurde Blattmaterial mit einem Plastikpistill in einem 2 ml Eppendorfgefäß zermörsert und nach Zugabe von 1 ml CTAB-Extraktionspuffer II für eine Stunde bei 64 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), eine fünfminütige Zentrifugation bei 15000 upm (Sigma 2 K 15 Zentrifuge), und die Überführung der oberen wässrigen Phase in ein neues Gefäß. Anschließend wurde die DNA mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M NaAcetat und 1 Volumen Isopropanol gefällt, 30 min bei 15000 upm und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl Aqua bidest. aufgenommen. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen von  $\lambda$ -DNA in einem Agarosegel.

Der CTAB-Extraktionspuffer II setzte sich wie folgt zusammen:

**CTAB-Extraktionspuffer II**

100	mM	Tris/HCl pH 8,0
20	mM	EDTA pH 8,0
1,4	M	NaCl
2	%	CTAB
1	%	PVP-40

### **2.2.3 Konstruktion verschiedener Primer und PCR-Amplifikation**

Für die Konstruktion von Primern, die zur Amplifikation des *atp9*-Gens geeignet sind, wurde in der Datenbank Mitbase (<http://www.ebi.ac.uk/Research/Mitbase/mitbase.pl>) nach allen bekannten *atp9*-Sequenzen gesucht. Insgesamt waren 14 entsprechende Sequenzen vorhanden. Mit Hilfe des Programms DIALIGN 2.1 (MORGENSTERN, 1999) wurden diese Sequenzen verglichen. Da es nur sehr geringe Abweichungen in der Basenfolge gab, ist das Gen zur Primerableitung gut geeignet. Zudem wurden 17 Sequenzen, die das *atp9*-Gen und flankierende Regionen enthielten, aus der Datenbank Mitbase herausgesucht. Ein Homologievergleich zeigte, daß am Anfang und am Ende dieser Sequenzen variable



Bereiche sind, wohingegen in der Mitte ein stark konservierter Bereich ist, in dem alle 17 Sequenzen nur sehr geringe Unterschiede der Basenfolge zeigen. Diese drei Bereiche wurden zur Primerkonstruktion genutzt. Außerdem wurden Primer von den Sequenzen des *nad9*-, *rpl16*- und *rpl5*-Gens, sowie von dem *orf25* aus *Arabidopsis thaliana* abgeleitet. Aufgrund der gefundenen konservierten Bereiche wurden Primerpaare mit Hilfe des Programms Primer Premier (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA) konstruiert. Dabei wurden folgende Kriterien berücksichtigt: Die Primer wurden so gewählt, daß sie nicht länger als 20 bp ( $\pm 2$  bp) sind, einen GC-Gehalt von ungefähr 50 % besitzen und keine Sekundärstrukturen im Primerbereich bilden. Die durch das Programm bestimmten  $T_m$ -Werte für die Schmelzpunkte der Nukleinsäuren sollten zwischen 50 und 60 °C liegen. Die beiden Primer sollten besonders an ihrem 3'-Ende nicht komplementär zueinander sein, um Anlagerung der Primer aneinander zu vermeiden.

Die als Primer eingesetzten Oligonukleotide sind von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert worden. In Tabelle 2.3 sind die Namen, die Sequenzen, die errechneten Schmelzpunkte und die Annealing-Temperatur der Primer angegeben.

**Tab. 2.3:** Verwendete Primer zur Amplifikation von mitochondrialer DNA

Bezeichnung des Primers	Sequenz des Primers	T <sub>m</sub> *	Annealing-Temperatur
atp9 S 24	5'-GGT GCC GGA GCC GCT ACA T-3'	63,5 °C	45 °C
atp9 AS 199	5'-GCC ATC ATT AGG GCA AAC A-3'	54,5 °C	45 °C
atp9 S 89	5'-CTT GAT CCA TTC CGT GGC G-3'	58,8 °C	45 °C
atp9 AS 201	5'-AGG CCA TCA TTA GGG CAA A-3'	54,5 °C	49 °C
afr S a	5'-TAA GAC TGG AAG GCT GC-3'	52,8 °C	49 °C
afr AS a	5'-CCC GCT CAG CAA TTG TA-3'	52,8 °C	49 °C
afr S b	5'-GCT RTM GGT ATT GGA AAC G-3'	54,5 °C	50 °C
afr AS b	5'-CCG GTT TAG TTT AAA GAG TCC-3'	55,9 °C	50 °C
nad9 S	5'-CCC AAG AAA TGG GTC AAA A-3'	52,4 °C	45 °C
nad9 AS 1	5'-GCA AAA TCG AAA TAG CGA-3'	49,1 °C	45 °C
nad9 AS 1	5'-AAA ATC GAA ATA GCG AAA-3'	44,6 °C	45 °C
orf 25 S	5'-TTG TGC ATT AAG TTC GAA-3'	46,9 °C	45 °C
orf 25 AS	5'-CCG AAC CAT TCT TAA GAC-3'	51,4 °C	45 °C
rpl 16 S 1	5'-CGG AAT CTC AGG TGT CAA A-3'	54,5 °C	50 °C
rpl 16 AS 1	5'-GCT AAT GTA GCG GCT TGT C-3'	56,7 °C	50 °C
rpl 16 S 2	5'-GCT CCT GCG GAA GTA TCT A-3'	56,7 °C	47 °C
rpl 16 AS 2	5'-TGA ACA ACA CAC GAG CAA T-3'	52,4 °C	47 °C
rpl 5 S	5'-TAT CAC GTC AAG ATC CGT TGC T-3'	58,4 °C	53 °C
rpl 5 AS	5'-CCG CTC CAC AGT GGT AAA GTC-3'	61,8 °C	53 °C

\* T<sub>m</sub> nach Angaben der Firma MWG Biotech AG

R = A und G, M = A und C

Für den PCR-Ansatz wurde folgende Zusammensetzung in einem Endvolumen von 25  $\mu$ l gewählt:

ca. 50	ng	DNA
je 200	$\mu$ M	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
2	mM	MgCl <sub>2</sub>
50	mM	KCl
10	mM	Tris/HCl pH 9
2	$\mu$ M	Forward-Primer
2	$\mu$ M	Backward-Primer
0,5	U	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (Eurogentec)

Um Evaporation während der PCR zu vermeiden, wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer Cetus nach folgenden Bedingungen:

1 Zyklus: 2 min bei 94 °C

30 Zyklen: 1 min bei 92 °C

1 min bei der entsprechenden Annealing-Temperatur (s. Tabelle 2.3)

2 min bei 72 °C

Nach Beendigung der PCR wurden 3  $\mu$ l Ladepuffer (50 % Glycerin, 0,4 % Bromphenolblau, 1 mM EDTA pH 8.0) zu dem Ansatz gegeben. Die Proben wurden auf 2 %igen Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA pH 8.0) elektrophoretisch bei 5 V/cm aufgetrennt. Als Marker diente dabei die 100 bp Leiter (Fa. Amersham Pharmacia).

## 2.2.4 Klonierung von PCR-Fragmenten

### Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolation des DNA-Fragmentes, das sequenziert werden sollte, wurde es zunächst mittels PCR amplifiziert (s. Kapitel 2.2.3). Anschließend wurde es in einem 1,5 %igem Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit dem Genclean Kit nach dem Protokoll der Firma Bio 101, indem die DNA nach dem Schmelzen der Gelmatrix an eine Glasmilch gebunden, gewaschen und schließlich wieder eluiert wurde.

### Ligation von PCR-Fragmenten

Zur Ligation von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pGEM-T der Firma Promega verwendet. Dieser Vektor besitzt in der ‚multiple cloning site‘ ein T, das komplementär zu dem überhängenden A eines PCR-Produktes ist. In diese ‚multiple cloning site‘ wird das Fragment ligiert. Das Volumen des isolierten PCR-Fragments wurde mittels Vakuumzentrifugation auf 3 µl reduziert. Für den Ligations-Ansatz wurde folgende Zusammensetzung in einem Endvolumen von 10 µl gewählt:

50 ng	pGEM-T Vektor
3 U	T4-Ligase
1 x	Rapid Ligations-Puffer
3 µl	PCR-Fragment

Der Ligations-Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer Cetus inkubiert.

### Transformation von *E. coli*

Zur schnellen Vermehrung von definierten DNA-Fragmenten, die in Plasmiden einkloniert sind, diente der Bakterienstamm *E. coli* XL 10 der Firma Stratagene. Die Transformation erfolgte nach dem von der Firma angegebenen Protokoll. Dazu wurden zu 40 µl

kompetenter Zellen, 1,6 µl des XL 10-Gold β-Mercaptoethanolmix hinzugegeben und nach dem Mischen für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von ca. 10 ng Plasmid-DNA und einer 30 minütigen Inkubation, folgte ein 30 Sekunden langer Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen 2 Minuten auf Eis inkubiert, mit 0,45 ml vorgewärmtem NZY-Medium gemischt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Jeweils 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (50 mg/l), X-Gal und IPTG (je 40 µl einer 20 mg/ml Stammlösung pro Platte) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**NZY-Medium**

0,5 %	NaCl
0,2 %	MgSO <sub>4</sub> x 7 x H <sub>2</sub> O
0,5 %	Hefeextrakt
1 %	Caseinhydrolysat

**LB-Medium**

1 %	Bactotrypton
0,5 %	Hefeextrakt
1 %	NaCl
(1,5 %	Agar)

**Überprüfung der Plasmide**

Vor der Plasmid-Isolierung wurde überprüft, ob die weißen Kolonien das gesuchte Fragment enthielten. Dazu wurde mit einem Zahnstocher ein Teil einer Kolonie abgenommen und durch Rühren des Zahnstochers im PCR-Ansatz die Bakterien-DNA als Template eingesetzt. Anschließend ist mit diesem Zahnstocher die Kolonie auf eine neue LB-Platte mit Ampicillin (50 mg/l) überimpft worden. Zum Schluß wurde der Zahnstocher in 5 ml flüssiges LB-Medium mit Ampicillin (50 mg/l) gegeben. Die Flüssigkultur und die LB-Agar-Platte wurden über Nacht bei 37 °C geschüttelt bzw. inkubiert.

Für den PCR-Ansatz wurde folgende Zusammensetzung in einem Endvolumen von 25  $\mu$ l gewählt:

je 0,2mM	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
4mM	MgCl <sub>2</sub>
50mM	KCl
10mM	Tris/HCl pH 9
0,2 $\mu$ M	M13-Primer
0,2 $\mu$ M	M13-Reverse-Primer
0,5 U	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (Fa. Eurogentec)

Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet, um Evaporation zu vermeiden. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer Cetus unter folgenden Bedingungen:

1 Zyklus: 1 min bei 94 °C

30 Zyklen: 1 min bei 92 °C  
1 min bei 50 °C  
2 min bei 72 °C

1 Zyklus: 5 min bei 72 °C

Die PCR Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Anhand des Ergebnisses wurden die Kolonien ausgewählt, aus denen die Plasmide isoliert wurden.

### **Plasmid Präparation**

Die Über-Nacht-Kultur der Bakterien wurde durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 15000 upm (Eppendorf Tischzentrifuge) in Eppendorfgläsern pelletiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Qiaprep-spin-Kits und dem dazugehörigen Protokoll der Firma Qiagen. Dabei werden die Bakterien nach RNase-Behandlung lysiert, die Zellwandbestandteile pelletiert und die Plasmid-DNA, die sich im Überstand befindet, an

eine Säulenmatrix gebunden. Nach zwei Waschschrritten wurde die Plasmid-DNA mit 100 µl 1 x TE eluiert.

### **2.2.5 Sequenzierung der Fragmente und Datenbank-Untersuchungen**

Die Sequenzierung der interessanten Klone wurde von Dr. Martin Meixner von der Universität Berlin durchgeführt. Dabei wurde für die automatische Sequenzierung das ABI PRISM-System (Version 2.1.1. ABIMED) verwendet. Die Sequenzierung erfolgte von beiden Seiten des Inserts her.

Die Analyse der Sequenzen wurde mittels der Programme BLASTN 2.0.11 und BLASTX 2.0.11 (ALTSCHUL et al., 1997) durchgeführt. BLASTN ist für die Suche nach Nukleinsäuresequenz-Homologien, wohingegen BLASTX die Nukleinsäuresequenz in Aminosäuresequenzen übersetzt und Homologien auf Proteinebene sucht. Dabei werden alle möglichen Leseraster untersucht und verglichen.

### **2.2.6 Konstruktion spezifischer Primer**

Zur Konstruktion von spezifischen Primern, die die sequenzierte Basenfolge des CMS-Fragmentes amplifizieren, wurden zunächst die Vektorsequenzen ermittelt und eliminiert. Anschließend wurden mit Hilfe des Programms Primer Premier (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA) vier Primer konstruiert. Die Namen, ihre Sequenzen, die errechneten Schmelzpunkte und die Annealing Temperaturen dieser Primer sind in Tabelle 2.4 angegeben. Auch bei diesen Primerkonstruktionen wurden die in Kapitel 2.2.3 genannten Kriterien berücksichtigt. Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Firma MWG Biotech AG durchgeführt.

**Tab. 2.4:** Spezifische Primer zur Amplifikation von Teilen des sequenzierten 900 bp-Fragmentes

<b>Bezeichnung des Primers</b>	<b>Sequenz des Primers</b>	<b>T<sub>m</sub><sup>*</sup></b>	<b>Annealing-Temperatur</b>
cms S 31	5'-TTT GAT TCA TGG AGT GGC TAG-3'	55,9 °C	52 °C
cms AS 458	5'-AAT CGC CAC TTT GTC CAA C-3'	56,7 °C	52 °C
cms S 45	5'-TGG CTA GAA ATC CCT CAT T-3'	52,4 °C	52 °C
cms AS 521	5'-CAN TGG TGG AAC AGN AGG T-3'	56,7 °C	52 °C

\* T<sub>m</sub> nach Angaben der Firma MWG Biotech AG

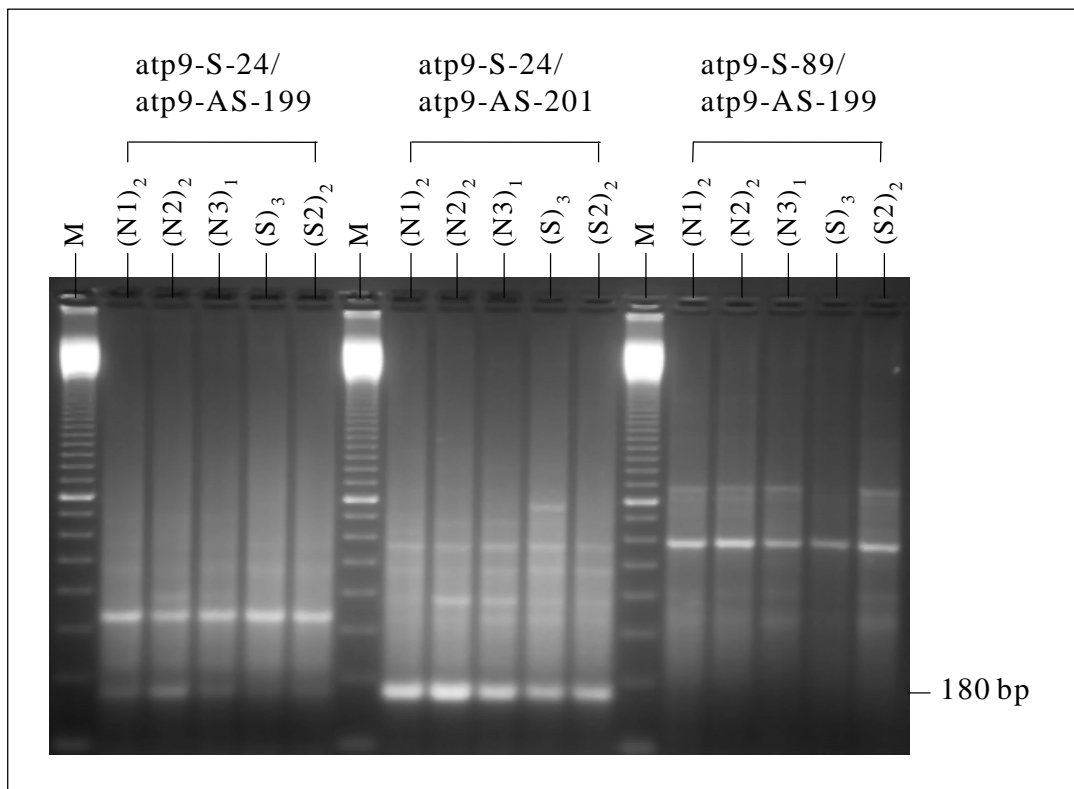
Die PCR-Analysen wurden wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die dabei verwendeten Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 2.4 angegeben.



## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Untersuchung des *atp9*-Gens

Bei Untersuchungen der CMS 2 mit Hilfe von *in organello*-Translationen wurden drei Proteinpolymorphismen entdeckt: ein 16,8 kDa Protein, das nur im (S2)-Cytoplasma vorkommt, ein 17,8 kDa Polypeptid, das nur im Normalcytoplasma translatiert wird, und ein Polymorphismus beim *atp9*-Gen (ENGELKE, 1999). Um diesen Polymorphismus auf DNA-Ebene nachzuweisen, wurde mit 14 verschiedenen pflanzlichen *atp9*-Sequenzen aus der Datenbank Mitbase (<http://www.ebi.ac.uk/Research/Mitbase/mitbase.pl>) ein Homologievergleich mit dem Programm DIALIGN2.1 (MORGENSTERN, 1999) durchgeführt. Das *atp9*-Gen ist stark konserviert, so daß mit Hilfe des Programms Primer Premier (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA) verschiedene degenerierte Primer (s. Tabelle 2.3) abgeleitet werden konnten. Bei der anschließenden PCR-Analyse, wurden diese Primer zu vier verschiedenen Paaren kombiniert und untersucht, jedoch konnten keine Unterschiede zwischen Pflanzen mit (N1)-, (N2)-, (N3)-Cytoplasma, CMS 1- und CMS 2-Pflanzen nachgewiesen werden. Zudem wurden nur mit den Primerpaaren *atp9*-S-24/*atp9*-AS-201 und *atp9*-S-89/*atp9*-AS-201 (s. Tabelle 2.3) eine Bande in der erwarteten Größe von 180 bp bzw. 112 bp amplifiziert. In Abbildung 2.1 ist solch eine PCR-Analyse mit drei Primerpaaren dargestellt, in der je fünf Pflanzen untersucht wurden, die die verschiedenen Normalcytoplasmen (N1), (N2) und (N3) oder die Sterilitätszytoplasmen (S) und (S2) trugen. In allen folgenden Abbildungen werden die Einzelpflanzen wie in Tabelle 2.1 (s. Kapitel 2.2.1) beschrieben mit ihrem Cytoplasmatyp und einem Index bezeichnet.



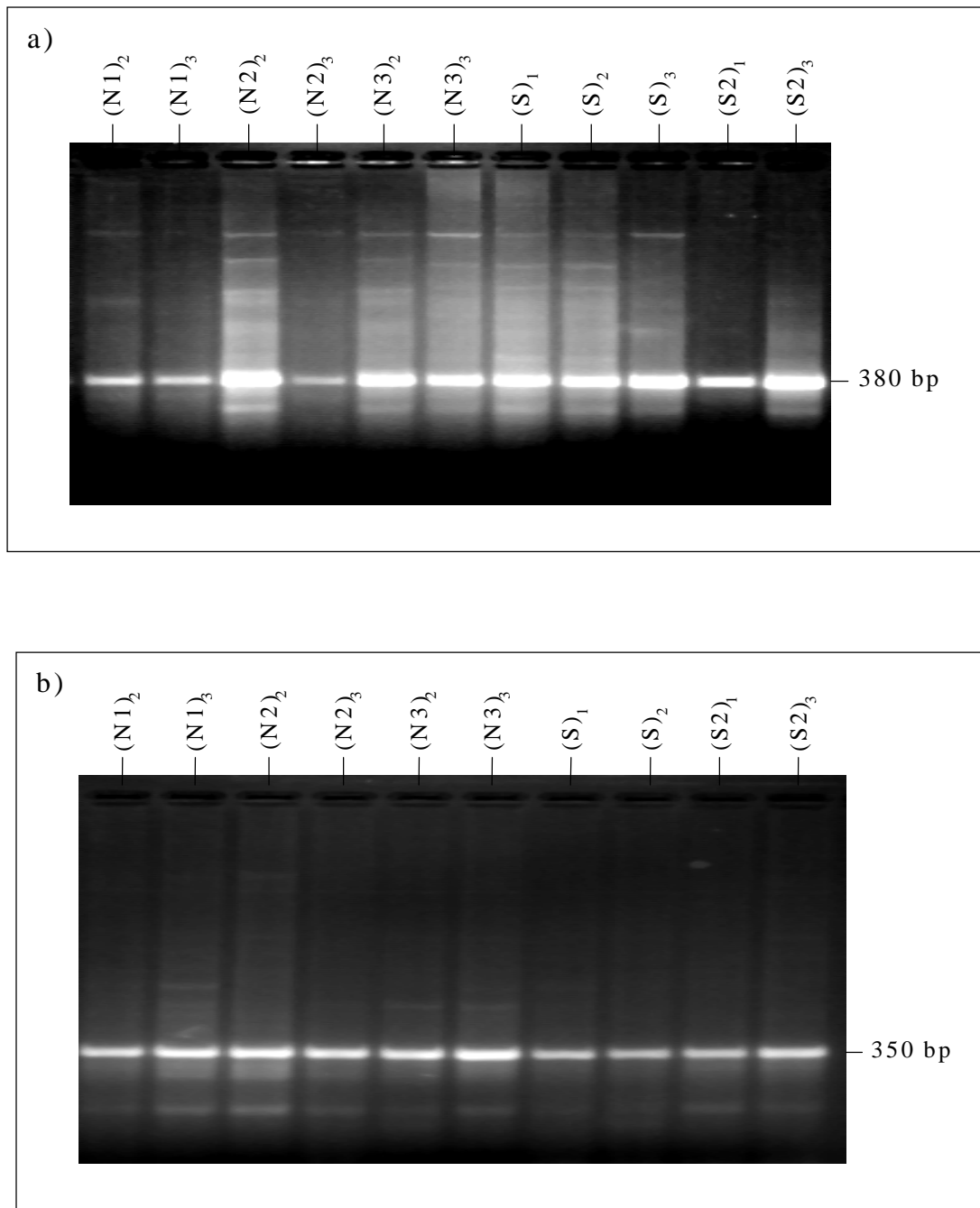
**Abb. 2.1:** Bandenmuster nach Amplifizierung des *atp9*-Gens aus *Allium schoenoprasum* L. mit verschiedenen Primerpaaren. M: 100 bp Leiter.

### 2.3.2 Untersuchung weiterer mitochondrialer Sequenzen zum Einsatz als molekulare CMS-Marker

Um einen molekularen Marker für die CMS zu finden, wurde die gesamte Region des *atp9*-Gens, die die *atp9*-Sequenzen und ihre flankierenden Bereiche umfaßt, einem Homologievergleich unterzogen. Es wurde ein weiterer stark konservierter Bereich gefunden und zwei schwach konservierte Bereiche, die zur Konstruktion der degenerierten Primer afr-S-a, afr-AS-a, afr-S-b und afr-AS-b (s. Tabelle 2.3) genutzt wurden.

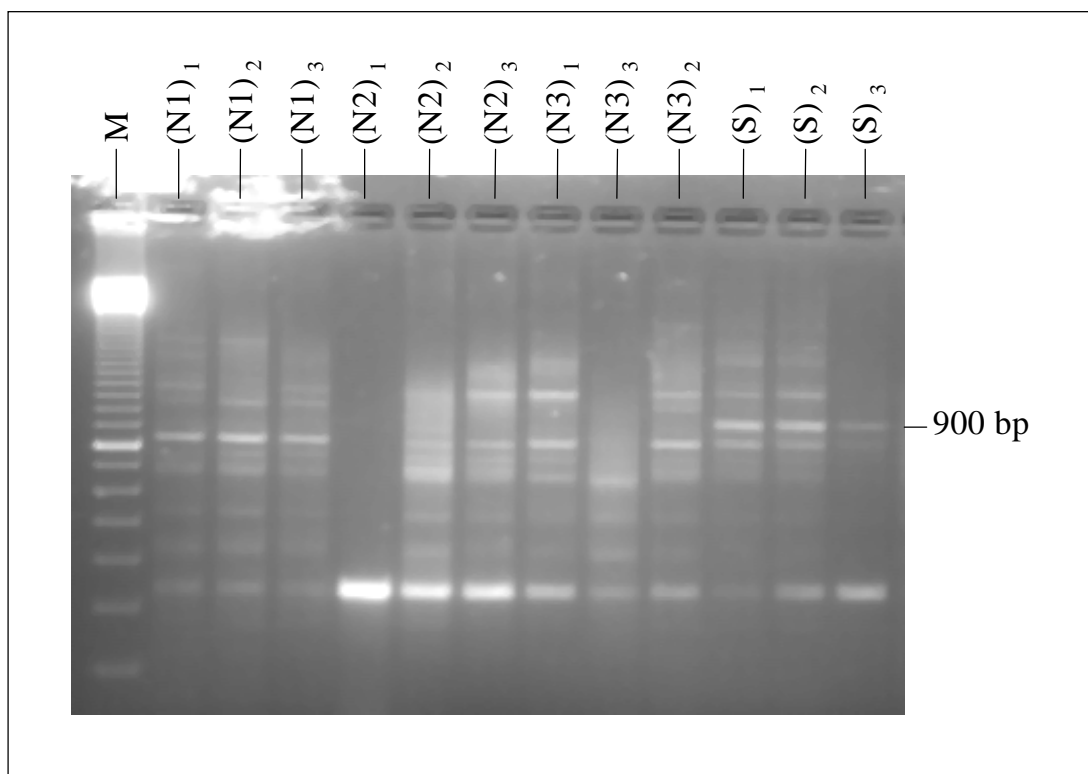
Aufgrund von *in organello*-Translationen, bei denen Proteine in sterilen Pflanzen gefunden wurden, deren Größe im Bereich von 18 kDa liegt (ein 18 kDa Protein, POTZ UND TATLIOGLU, 1993 und ein 16,8 kDa Protein, ENGELKE, 1999), wurden in

Datenbanken mitochondriale Proteine dieser Größe gesucht. Es wurden vier solcher Sequenzen gefunden: *nad9*, *rpl5*, *rpl16* und *orf25*, von denen weitere degenerierte Primerpaare (s. Tabelle 2.3) abgeleitet wurden.



**Abb. 2.2:** Amplifikationsprodukte mit den *rpl16*- (a) und *rpl5*-Primern (b).

Bei PCR-Analysen mit diesen Primern zeigte sich, daß mit den *rpl16*-Primern eine monomorphe Bande amplifiziert wurde, die eine Größe von 380 bp hat. Diese Bande ist 61 bp kleiner als die erwartete Bande (Abbildung 2.2 a). Bei weiteren Experimenten mit den *rpl5*-Primern wurde eine 492 bp große Bande erwartet. Die Länge des Fragmentes betrug jedoch nur 350 bp (Abbildung 2.2 b). Bei allen untersuchten Pflanzen war auch bei diesen PCR-Analysen das Bandenmuster monomorph. Bei Amplifikationen mit *afr-a*, *nad9*- und *orf25*-Primern konnten keine Unterschiede zwischen Normal- und Sterilitätscytoplasma in dem Bandenmuster gefunden werden. In Abbildung 2.3 ist eine PCR-Analyse mit dem Primerpaar *afr-S-b/afr-AS-b* dargestellt, in der Pflanzen mit dem Cytoplasma (N1), (N2) oder (N3) mit CMS 1-Pflanzen verglichen werden. Es ist eine 900 bp Bande vorhanden, die nur bei den (S)-Cytoplasma tragenden Pflanzen auftritt. Wiederholungen dieser Untersuchungen mit diesem Primerpaar und DNA aus verschiedenen fertilen und sterilen Pflanzen, wobei zusätzlich das (S2)-Cytoplasma untersucht wurde, bestätigten das Ergebnis.

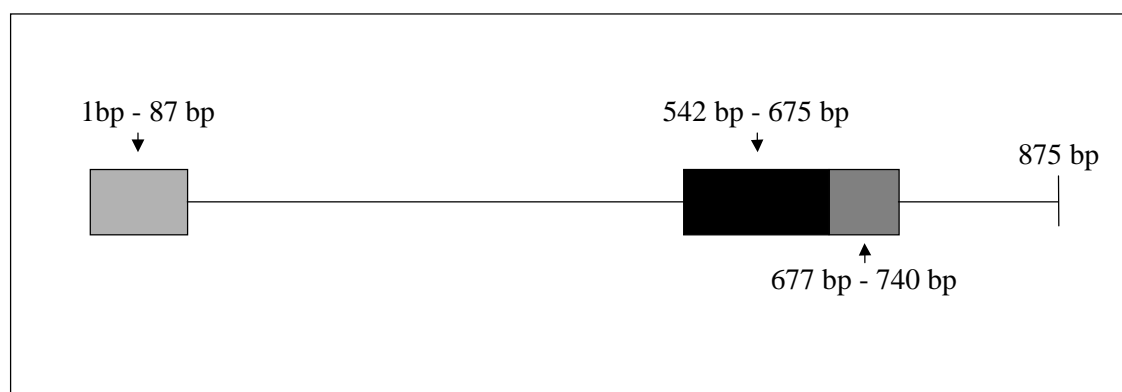


**Abb. 2.3:** PCR-Analyse mit dem Primerpaar *afr-S-b/afr-AS-b*. M: 100 bp Leiter.

Diese Bande wurde isoliert, kloniert und anschließend sequenziert. Sie wird im folgenden als CMS 1.1-900 bp-Fragment bezeichnet.

### 2.3.3 Datenbankvergleiche

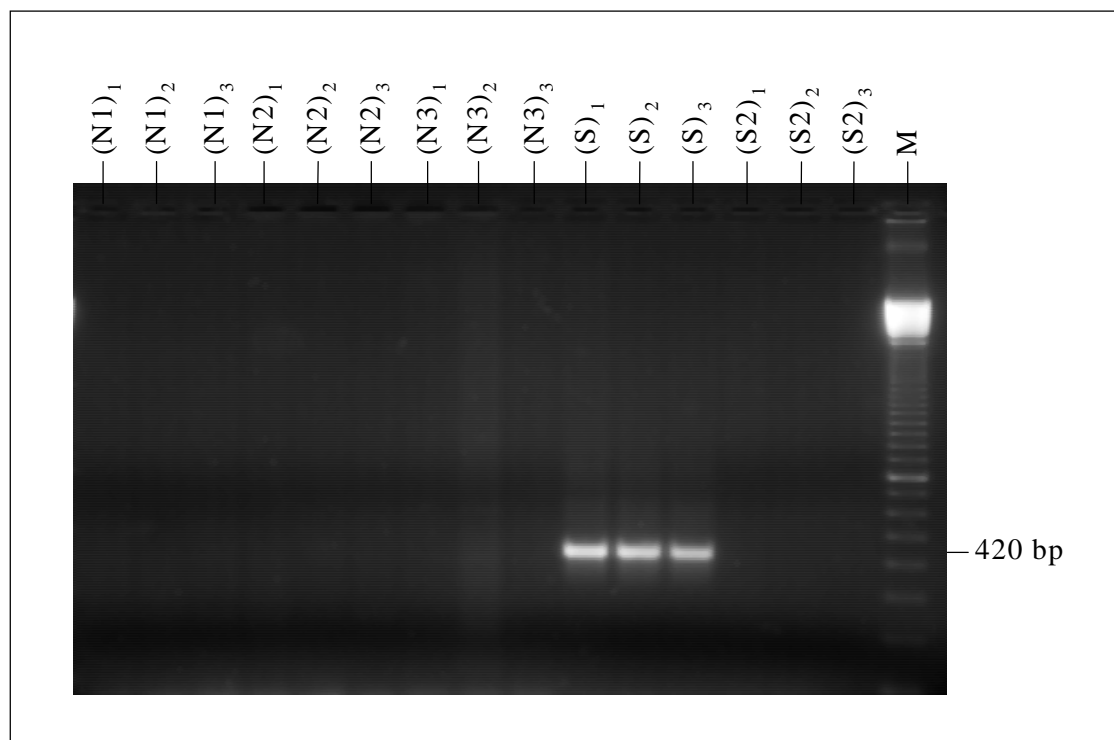
Die genaue Länge des CMS 1.1-900 bp-Fragments beträgt 875 bp. Dies weicht nur geringfügig von der durch die Agarosegelelektrophorese bestimmten Größe von 900 bp ab, nach der das Fragment benannt wurde. Die Sequenz des Fragmentes wurde mit den Programmen BLASTN 2.0.11 und BLASTX 2.0.11 (ALTSCHUL et al., 1997) untersucht. BLASTN findet Homologien auf der Nukleotid-Ebene wohingegen BLASTX Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz mit Datenbanksequenzen findet. Insgesamt wurden 3 Bereiche gefunden, die Homologien zu anderen Genen aufweisen. In Abbildung 2.4 sind diese schematisch dargestellt. In den Bereichen von 1-87 bp und 677-740 bp wurde 89 % bzw. 93 % Ähnlichkeit zum *atp9*-Gen gefunden. Die beiden Bereiche sind nicht homolog zueinander und deswegen in Abbildung 2.4 in verschiedenen Blautönen dargestellt. In dem Bereich von 542-675 bp liegt eine 94 %ige Homologie zum *atp6*-Gen vor. Innerhalb der homologen Basenfolge wurden keine Start- oder Stopcodons gefunden. Um einen sicher auswertbaren molekularen Marker für die CMS 1 zu erhalten wurden spezifische Primer für das CMS 1.1-900 bp-Fragment abgeleitet.



**Abb. 2.4:** Homologievergleich der CMS1.1-900 bp Sequenz. □ ■ Homologien zum *atp9*-Gen; ■ Homologie zum *atp6*-Gen, Position ist in bp angegeben.

### 2.3.4 Untersuchung verschiedener Cytoplasmotypen mit den spezifischen Primern zur Amplifizierung von Teilstücken des CMS 1.1-900 bp-Fragmentes

Die fünf verschiedenen Cytoplasmotypen wurden mit den spezifischen Primern (siehe Tabelle 2.4) zur Amplifizierung von Teilen des CMS 1.1-900 bp-Fragmentes untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die Primerpaare cms-S-31/cms-AS-458 und cms-S-31/cms-AS-521 für diese Untersuchungen am besten geeignet sind. Mit dem Primerpaar cms-S-31/cms-AS-458 wurden nur bei den CMS 1-Pflanzen Amplifikationsprodukte gefunden (Abbildung 2.5), die 420 bp lang sind. Diese Bande wird im folgenden als CMS 1.1-420 bp-Fragment bezeichnet.

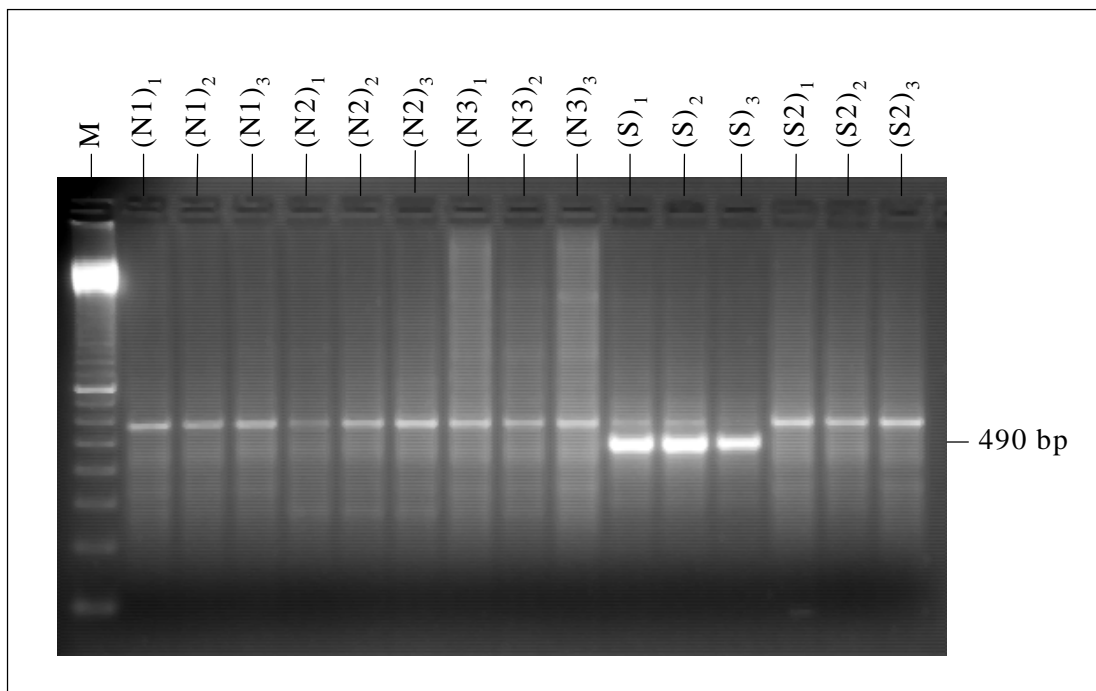


**Abb. 2.5:** Amplifikationsprodukte mit dem Primerpaar cms-S-31/cms-AS-458.

M: 100 bp Leiter.

In Abbildung 2.6 ist eine PCR-Analyse mit dem Primerpaar cms-S-31/ cms-AS-521 dargestellt. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß neben einem 490 bp langen Teil

des CMS 1.1-900 bp-Fragmentes eine weitere Bande amplifiziert wird, die in allen Normal- und Sterilitätscytoplasmen auftritt. Dieses Primerpaar hat den Vorteil, daß die zusätzliche monomorphe Bande als Kontrolle dienen kann, daß die PCR prinzipiell erfolgreich war. Jedoch ist diese zusätzliche Bande bei Pflanzen mit dem Sterilitätscytoplasma CMS 1 oft schwächer ausgeprägt, weil in der PCR eine Konkurrenzreaktion stattfindet, die in vielen PCR-Analysen zu Gunsten des CMS 1.1-Fragmentes ausfällt. Bei weiteren Untersuchungen, in denen Normal- und Sterilitätscytoplasmen miteinander verglichen wurden, wurde das Primerpaar cms-S-31/cms-AS-521 eingesetzt. Die sterilitäts-assoziierte 490 bp Bande wird CMS 1.1-490 bp-Fragment genannt.

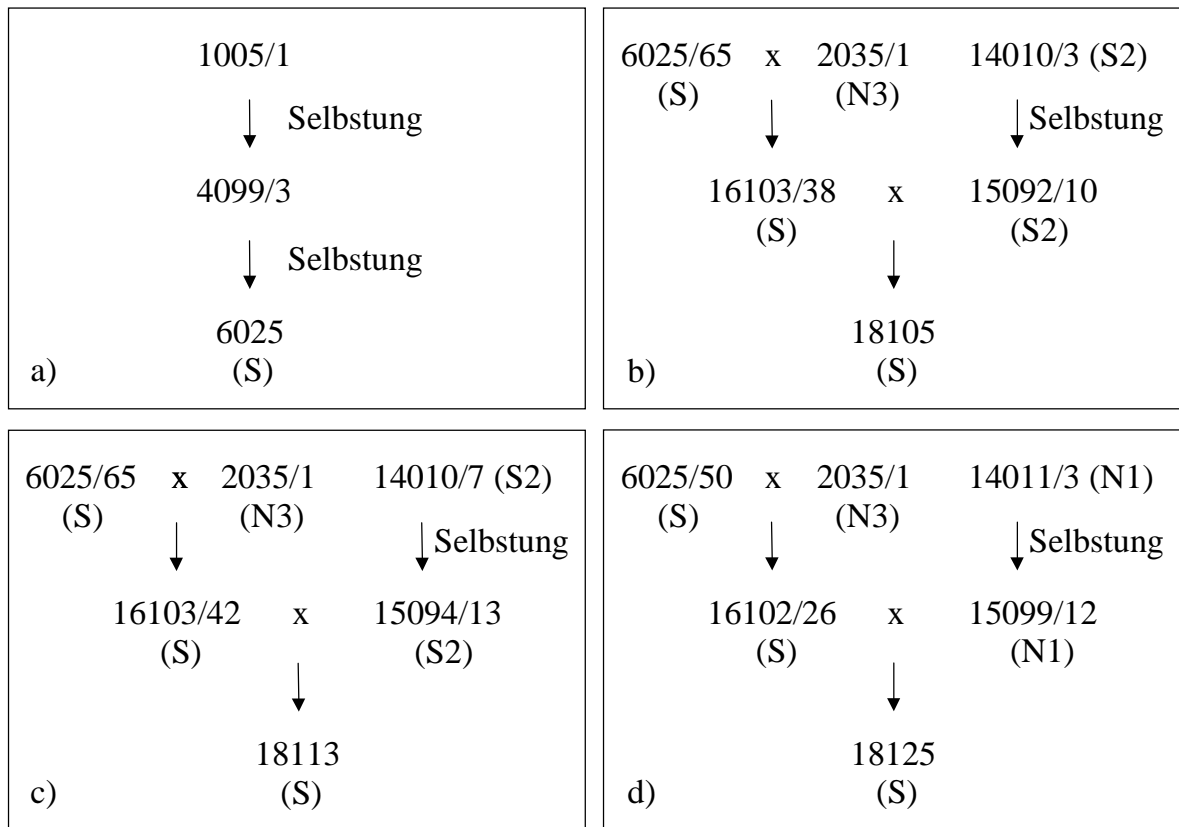


**Abb. 2.6:** Bandenmuster nach Amplifikation mit dem Primerpaar cms-S-31/cms-AS-521. M: 100 bp Leiter.

### 2.3.5 Die CMS 1.1-Fragmente als molekulare Marker

Bei mitochondrialer DNA ist der Nachweis eines Marker-Locus durch eine Kopplungsanalyse nicht möglich, weil Mitochondrien nicht der Meiose unterliegen,

sondern maternal vererbt werden. Deshalb wurden folgende Experimente durchgeführt, um zu bestätigen, daß die Primer für die Amplifikation des CMS 1.1-420 bp- und des CMS 1.1-490 bp-Fragmentes als Marker für die CMS 1 eingesetzt werden können.

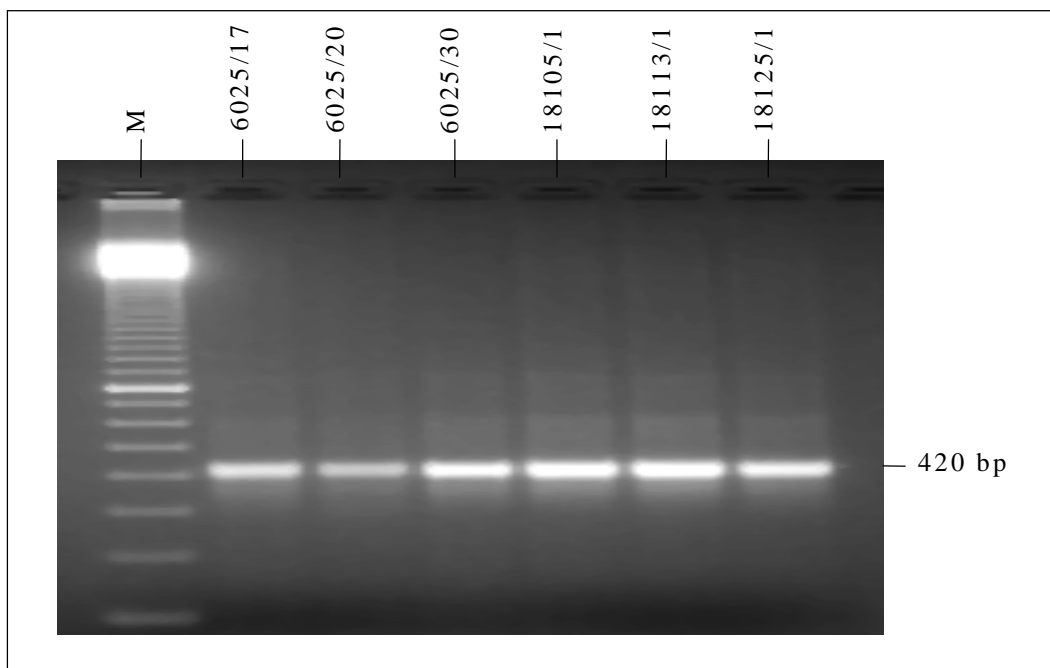


**Abb. 2.7:** Abstammung der Linien 6025 (a), 18105 (b), 18113 (c) und 18125 (d).

Untersucht wurden Pflanzen, deren Mutter eine CMS-Pflanze mit (S)-Cytoplasma ist und deren Vater ein Maintainer mit (N3)- oder (S2)-Cytoplasma ist (Abbildung 2.7 b-d)) und die Linie 6025, die aus einer Selbstung hervorgegangen ist, in der die CMS auftrat (Abbildung 2.7 a)). Wichtig war hierbei, daß die DNA des Zellkerns unterschiedlich zusammengesetzt war, um einen Einfluß der nuklearen DNA auf das Vorhandensein der CMS 1.1-Fragmente zu prüfen bzw. auszuschließen. Dies wurde erreicht, da die Pflanzen 6025/65 bzw. 6025/50, die bei den Kreuzungen verwendet wurden, eine andere Zusammensetzung der DNA im Zellkern haben als die Pflanze 2035/1. Diese drei Pflanzen wiederum unterscheiden sich sehr stark von den Pflanzen 14010/3, 14010/7 und

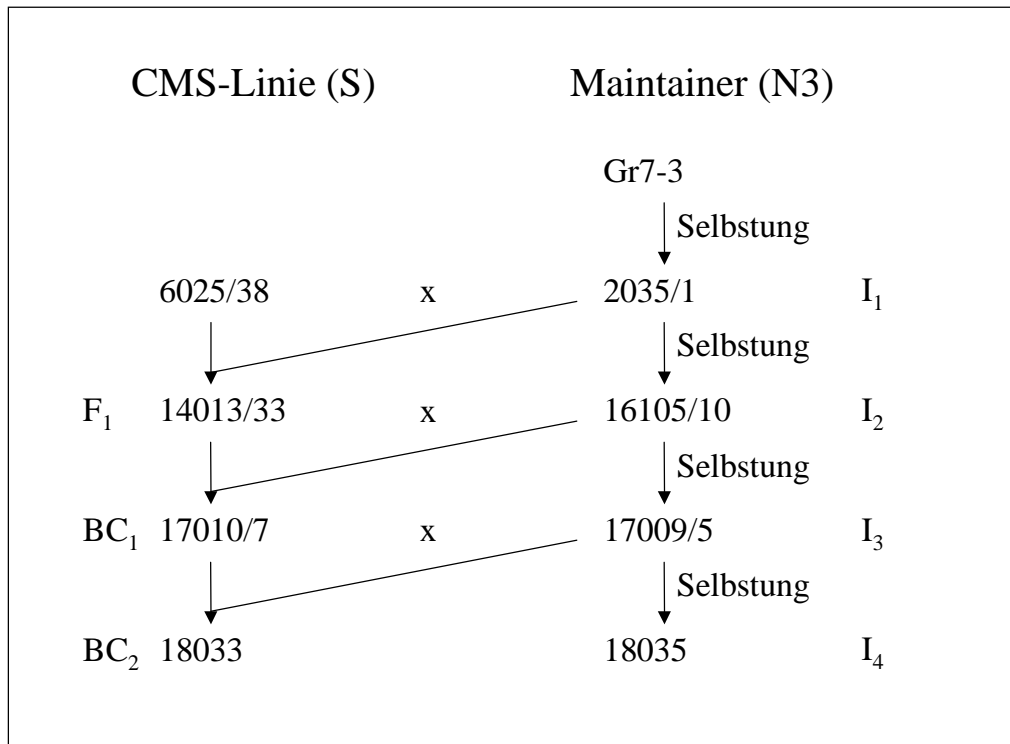


14011/3 bezüglich des Kerngenoms. Die untersuchten Pflanzen 18113, 18105, 18125 tragen somit zu 25 % dieselben Gene wie die zur Kreuzung verwandte Pflanze aus der Linie 6025 (siehe Abbildung 2.7). Damit haben sie mindestens zu 75 % andere Gene als die drei Pflanzen der Linie 6025, die ebenfalls analysiert wurden. Außerdem sind weiter 25 % der Gene der analysierten Individuen identisch mit der Pflanze 2035/1 und 50 % mit den Kreuzungseltern 15094/13, 15092/10 oder 15099/12. Die Abstammung dieser Pflanzen ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Im Gegensatz zu Abbildung 2.7 b)-d) konnte in Abbildung 2.7 a) nur der Cytoplasmotyp der Linie 6025 angegeben werden, da die Pflanzen der Linie 1005 und 4099 nicht erhalten geblieben sind und somit keine Untersuchung des Cytoplasmatyps durch Southern-Hybridisierungen möglich war. Durch die PCR-Analysen (Abbildung 2.8) konnte gezeigt werden, daß trotz verschiedener DNA-Zusammensetzung des Nukleus, das CMS 1.1-420 bp-Fragment immer amplifiziert wurde. Damit liegt ein erster Beweis vor, daß die Kerngene keinen Einfluß auf das Vorhandensein dieses Fragmentes haben, sondern eine maternale Vererbung vorliegt.

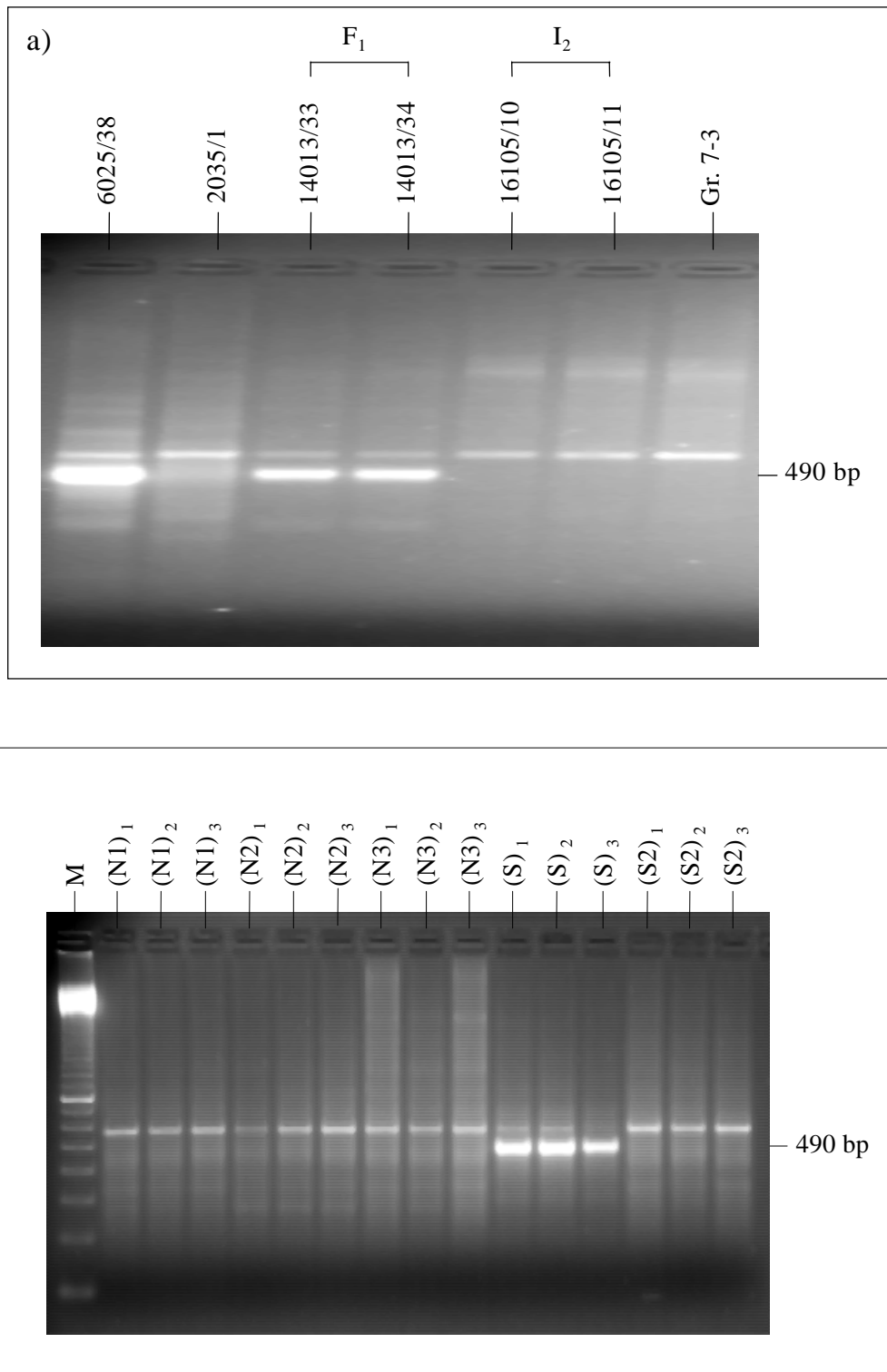


**Abb. 2.8:** Amplifikationsprodukte mit dem Primerpaar cms-S-31/cms-AS-458 von Pflanzen mit verschiedenen Kernhintergründen. M: 100 bp Leiter.

Das Kriterium für die Auswahl der Pflanzen, die in der vorangegangenen Untersuchung analysiert wurden (siehe Abbildung 2.8), war ihre unterschiedliche Zusammensetzung im Kerngenom. In den PCR-Analysen wurde genomische DNA eingesetzt, so daß nicht nur das Chondriom sondern auch das Kerngenom einen Einfluß auf das Vorhandensein der CMS 1.1-Fragmente haben kann. Um nachzuweisen, daß nicht zufällig in allen untersuchten Pflanzen ein Locus vorhanden war, der diesen dominanten Marker kodieren könnte, wurde in einer weiteren Untersuchung der Einfluß der Kerngene erneut geprüft. Gleichzeitig wurde auch analysiert, ob die CMS 1.1-Fragmente stabil über mehrere Generationen vererbt werden. In Abbildung 2.9 ist die Abstammung der untersuchten Pflanzen dargestellt. Falls die CMS 1.1-Fragmente dominante Marker wären, so wird in der  $F_1$  eine 1:1 Spaltung erwartet, wenn der sterile Elter heterozygot ist. Wenn er jedoch homozygot ist, so zeigen alle Nachkommen das CMS 1.1-490 bp-Fragment. In allen darauffolgenden Rückkreuzungsgenerationen wird eine 1:1 Spaltung erwartet, sofern ein steriler Elter aus der  $F_1$  bzw. der Rückkreuzungsnachkommenschaft für die Kreuzung verwendet wurde, bei dem die CMS 1.1-Fragmente nachgewiesen wurden. Bei maternaler Vererbung hingegen darf keine Segregation auftreten, sondern in allen CMS 1-Pflanzen muß nach der PCR das CMS 1.1-490 bp-Fragment auftreten. In den in Abbildung 2.10 a) und b) dargestellten Experimenten wurden die ursprünglichen Eltern (6025/38 und Gr7-3) der  $F_1$ , je zwei Pflanzen der  $F_1$ ,  $BC_1$ ,  $I_2$  und  $I_3$  untersucht. Von der  $BC_2$  und der  $I_4$  wurden jeweils 6 Pflanzen mittels PCR analysiert. Durch die Experimente konnte gezeigt werden, daß tatsächlich nur die untersuchten Pflanzen mit (S)-Cytoplasma das CMS 1.1-490 bp-Fragment aufweisen (Abbildung 2.10). Durch den Nachweis der stabilen maternalen Vererbung kann auch die Bande als Marker für die CMS 1 eingesetzt werden.



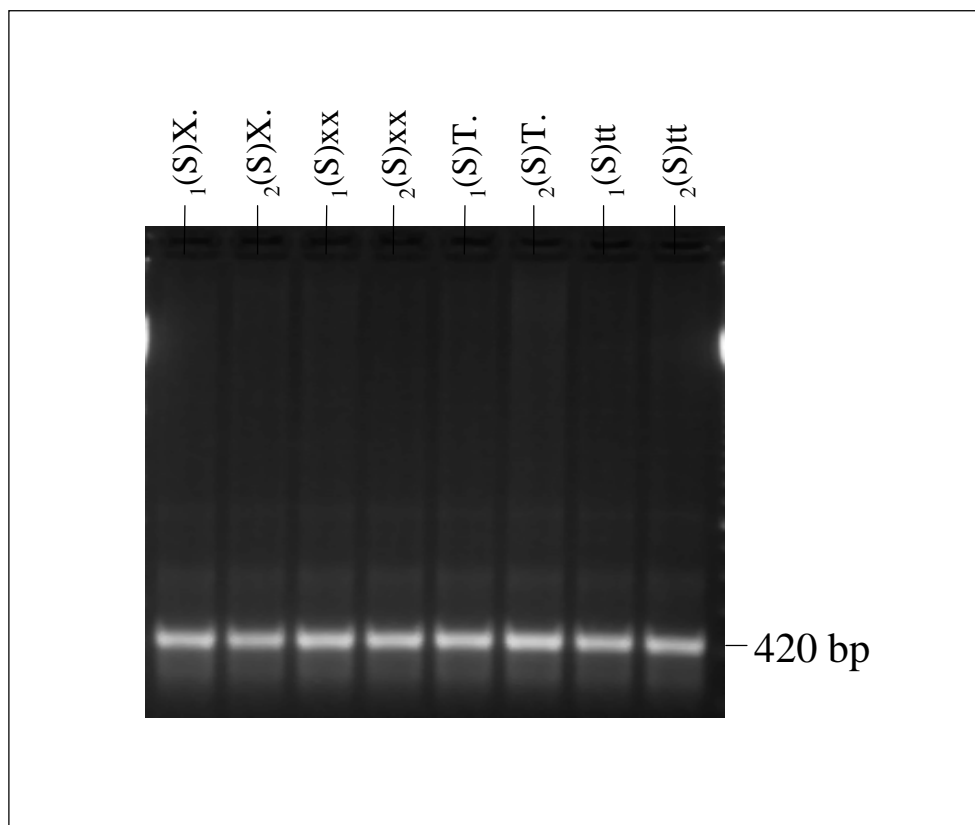
**Abbildung 2.9:** Kreuzungsschema zur Erstellung der untersuchten Rückkreuzungsgenerationen und Selbstungen. BC: Rückkreuzungsgeneration; I: Inzuchtlinie.



**Abb. 2.10:** Nachweis der stabilen maternalen Vererbung durch PCR mit dem Primerpaar cms-S-31/cms-AS-521 BC: Rückkreuzungsgeneration; I: Inzuchtlinie; Pflanzen mit (S)-Cytoplasma: 6025/38, Individuen der F<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>; Pflanzen mit (N3)-Cytoplasma: Gr7-3, 2035/1, Individuen der I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub> und I<sub>4</sub>.

### 2.3.6 Untersuchung restorierter Pflanzen mit dem CMS 1 Marker

In weiteren Untersuchungen wurden restorierte Pflanzen mit dem Primerpaar cms-S-31/cms-AS-458 analysiert. Die Restoration erfolgte bei einigen Pflanzen durch das *X/x*-Gen, das im dominanten Zustand Pollenfertilität bewirkt (TATLIOGLU, 1982). Weitere Pflanzen wurden durch das *T/t*-Gen restoriert. Dessen dominantes Allel vermittelt eine Temperatursensitivität. Die Überwindung der männlichen Sterilität erfolgt bei diesen Pflanzen durch Kultivierung bei hohen Temperaturen (24 °C Tag/Nacht, TATLIOGLU, 1987). Pflanzen bei denen das *A/a*-Gen homozygot rezessiv vorliegt und deren Fertilität durch Besprühen mit Tetracyclin etwa 14 Tage vor der Blüte wiederhergestellt wird (TATLIOGLU UND WRICKE, 1988; RUGE et al, 1993), konnten aus technischen Gründen nicht untersucht werden.



**Abb. 2.11:** Untersuchung von Restorierten Pflanzen mit dem Primerpaar cms-S-31/cms-AS-458.

In Abbildung 2.11 ist die Untersuchung von Pflanzen, die durch das *X/x*-Gen bzw. das *T/t*-Gen restoriert wurden, mit dem CMS 1 Marker dargestellt. Auch die restorierten Pflanzen zeigten das CMS 1.1-420 bp-Fragment, das bei den sterilen CMS-Pflanzen amplifiziert wird. Die Restorergene haben demnach keinen Einfluß auf das Vorhandensein des Markerlocus.

## 2.4 Diskussion

Zur Identifizierung der CMS-assoziierten Sequenz von *Allium schoenoprasum* L. wurden verschiedene Primerpaare eingesetzt, nur das Primerpaar arf-s-b/arf-AS-b führte zu einem sterilitäts-assoziierten Polymorphismus. Nach der Isolierung des CMS 1.1-900 bp-Fragmentes und anschließender Sequenzierung, wurden Primer abgeleitet, um nachzuweisen, daß es sich bei dem Fragment um einen CMS 1-Marker handelt. Die Mitochondrien werden beim Schnittlauch maternal vererbt. Für diese Art der Vererbung gibt es keine statistischen Auswertungsmöglichkeiten. Für den experimentellen Nachweis wurde der Einfluß verschiedener Kerngenom-Zusammensetzungen auf das Vorhandensein des Markers CMS 1.1-420 bp bzw. CMS 1.1-490 bp untersucht. Die dabei verwendeten Pflanzen trugen alle das (S)-Sterilitätscytoplasma. Wenn das CMS 1.1-Fragment kernkodiert wäre, würde es sich wie ein dominanter Marker verhalten und bei Untersuchung mehrerer Pflanzen müßten auch Individuen vorhanden sein, in denen das CMS 1.1-Fragment nicht vorkommt. In einem ersten Versuch (siehe Abbildung 2.8) zeigte sich kein Einfluß des Kerngenoms auf die Anwesenheit des CMS 1.1-420 bp Fragmentes. In dieser Untersuchung wurden nur wenige Pflanzen verwendet, die zufällig alle im Kerngenom den untersuchten Locus tragen könnten. Deshalb wurden zusätzlich ein  $F_1$  und zwei Rückkreuzungsgenerationen ( $F_1$ ,  $BC_1$ , und  $BC_2$ ; siehe Abbildung 2.9) und drei Inzuchtlinien ( $I_2$ ,  $I_3$  und  $I_4$ ), die durch fortgesetzte Selbstung der Maintainerpflanze entstanden, analysiert. Außerdem wurden die Eltern der  $F_1$ , von denen der eine männlich steril (6025/38) und der andere ein Maintainer war, sowie die Gr3-7 Pflanze in diese Untersuchung mit einbezogen. Wenn es sich um einen dominanten kernkodierten Marker handeln würde, liegt in der  $F_1$  eine 1:1 Spaltung vor, wenn der sterile Elter heterozygot ist und keine Segregation, wenn dieser homozygot ist. In der  $BC_1$  und der  $BC_2$  müßte eine 1:1 Spaltung gefunden werden, wenn bei dem verwendeten sterilen Elter das CMS 1.1-Fragment vorhanden ist und dieser Elter aus einer vorherigen  $F_1$  bzw. Rückkreuzungsgeneration stammt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P = 5\%$  würden mindestens eine der untersuchten sechs Pflanzen der  $BC_2$  keine Bande zeigen. Jedoch war in allen sechs Pflanzen der  $BC_2$  das CMS 1.1-490 bp-Fragment vorhanden. Es zeigte sich erneut, daß die Kerngene keinen Einfluß auf die Ausprägung des CMS 1.1-Fragmentes haben, sondern nur der

Cytoplasmotyp (siehe Abbildung 2.10). Zudem konnte eine stabile Vererbung nachgewiesen werden, da in allen untersuchten Rückkreuzungsgenerationen die CMS 1.1-Fragmente vorhanden waren, so daß diese Fragmente als Marker eingesetzt werden können.

Die untersuchten Primerpaare finden auch eine praktische Anwendung. Sie können dazu benutzt werden Populationen zu screenen und so Pflanzen zu isolieren, die das (S)-Cytoplasma der CMS 1 tragen. Auch bei anderen Arten, bei denen die CMS näher untersucht ist, können entweder vorhandene Marker oder Primer, die von der bekannten Sequenz des sterilitäts-assoziierten offenen Leserasters abgeleitet wurden, für solche Untersuchungen eingesetzt werden. Möglich ist dies beispielsweise beim T- und S-Cytoplasma vom Mais, dem PET1-Cytoplasma der Sonnenblume, beim cam-, nap- und pol-Cytoplasma von *Brassica napus*, beim A3-Cytoplasma von *Sorghum bicolor* und vielen anderen (bekannte CMS-Sequenzen zusammengefaßt in ELKONIN UND TYRNOV, 2000).

Die Sequenzierung des CMS 1.1-Fragmentes und die anschließende Analyse zeigte, daß keine Start- oder Stopkodons vorhanden sind. Bei der Untersuchung wurden nicht nur die konventionellen Start- und Stopkodons (ATG, TAA, TAG und TGA) berücksichtigt sondern auch mitochondrien-spezifische Startkodons (AAT, GGG und GTG, MARIENFELD et al., 1999).

Datenbankvergleiche mit BLASTN 2.0.11 und BLASTX 2.0.11 (ALTSCHUL et al., 1997) zeigten, daß die untersuchte DNA-Sequenz chimer ist. Es wurden zwei Bereiche gefunden, die homolog zum *atp9*-Gen sind und einer, der eine Sequenzidentität zum *atp6*-Gen aufweist (siehe Abbildung 2.4). Homologien zu CMS-Sequenzen aus anderen Pflanzenarten wurden nicht gefunden.

Das *atp9*-Gen hat eine Länge von mindestens 224 bp, zum Beispiel bei *Brassica napus* (HANDA, 1993), Sojabohne (GRABAU et al., 1990) und Apfel (KATO et al., 1995). Größere Sequenzen wurden bei der Zuckerrübe (266 bp, XUE et al., 1989), der Sonnenblume (251 bp, RECIPON, 1990) und der Tomate (233 bp, KARAMA et al., 1990) gefunden. Die zum *atp9*-Gen gefundenen Homologien in der Sequenz des CMS 1.1-Fragmentes sind



87 bp bzw. 63 bp lang und repräsentieren damit ca. 38,8 % bzw. 29 % der Gesamtsequenz. Die beiden Teilsequenzen des *atp9*-Gen zeigen keine Homologien zueinander. Die homologen Sequenzen liegen im *atp9*-Gen nebeneinander, getrennt durch ein ca. 14 bp langes Stück: zuerst das 87 bp und dann das 63 bp Fragment. Sie sind in etwa 60 bp vom 5'-Ende und 7 bp vom 3'-Ende des *atp9*-Gens entfernt

Die Länge des *atp6*-Gens ist bei der Zuckerrübe 752 bp (XUE et al., 1994), bei *Brassica napus* 780 bp (HANDA UND NIKAJIMA, 1992) und bei *Vicia faba* 875 bp (MACFARLANE et al., 1990). Der zum *atp6*-Gen homologe Bereich ist 133 bp lang und entspricht ca. 17 % der Sequenz dieses Gens. Die Homologe Sequenz liegt im *atp6*-Gen näher am 5'-Ende als am 3'-Ende. Beim Vergleich mit der Sequenz des Mais, fängt sie 142 bp nach dem 5'-Ende an, bei der Sonnenblume sind es 215 bp.

Der Homologievergleich zeigte, daß die Sequenz des CMS 1.1-Fragmentes chimer ist, also aus Teilsequenzen von mitochondrialen Genen und nicht identifizierten Sequenzen besteht. Bei fast allen CMS assoziierten offenen Leserastern wurden ebenfalls chimere Sequenzen gefunden. Der *orf263* des Tour-Cytoplasmas aus *Brassica tournefortii*, der männliche Sterilität bedingt, zeigt eine Inkompatibilität zu den Kerngenomen von *Brassica napus* und *Brassica juncea*. Dieses offene Leseraster zeigt Homologien zum *nad5*-Gen und zum *atp9*-Gen aus dem „Tokumasu“-Cytoplasma von *Raphanus sativus* (LANDGREN et al., 1996). Bei *Helianthus annuus* wurde eine 11 kb-Inversion und eine 5 kb-Insertion gefunden. Der *orfH522* ist in der Insertion lokalisiert und zeigt Ähnlichkeiten zum *orfB* von *Oenothera* und dem *atp9*-Gen. Außerdem beinhaltet dieses offene Leseraster unbekannte Sequenzen und wird mit dem *atpA*-Gen kotranskribiert (KÖHLER et al., 1991). Das *pcf*-Gen („Petunia CMS assoziiated fusion“, YOUNG und HANSON, 1987) wurde bei der Petunia als CMS-assozierte Sequenz gefunden. Es wird mit dem *nad3*-Gen kotranskribiert. Die *pcf*-Sequenz zeigt eine Homologie zum *atp9*-Gen und zum *coxII*-Gen. Außerdem wurde bei der Petunie ein unbekanntes offenes Leseraster, das *urf-S*, identifiziert (RASSMUSSEN und HANSON, 1987). Bei *Lolium perenne* wurde in der Linie CMS9B290 der *orf-C9* gefunden. Diese Sequenz ist sterilitäts-assoziert und besitzt Ähnlichkeit mit dem *atp9*-Gen (KIANG und KAVANAGH, 1996). Im A3-Cytoplasma von *Sorghum bicolor* wird die CMS durch den *orf107* verursacht. Auch dieser offene Leserahmen zeigt Ähnlichkeiten zum *atp9*-Gen, zum *atp6*-Gen und zum

sterilitäts-assoziierten *orf79* vom Reis (TANG et al., 1996). Eine weitere CMS-Sequenz, die Homologien zum *atp6*-Gen und *atp9*-Gen besitzt, ist vermutlich die *atp6-C*-Sequenz des C-(Charrua) Cytoplasmas vom Mais (DEWEY et al., 1991). Bei der TURF2H3-Sequenz im T-Cytoplasma vom Mais sind Sequenzabschnitte unbekannter Herkunft gefunden worden. Zudem wurden Ähnlichkeiten zum *atp6*-Gen, zum Chloroplasten t-RNA-Gen für Arginin und zum *rrn26* gefunden. Außerdem wurden die beiden offenen Leseraster, *orf13* und *orf25* identifiziert (DEWEY et al., 1986).

Obwohl diese Sequenzen, die als Beispiel gewählt wurden, alle Homologien zum *atp6*- und/oder dem *atp9*-Gen besitzen, werden nur wenige CMS-Sequenzen gefunden, die untereinander Homologien zeigen. Zu diesen seltenen Fällen gehören beispielsweise die Ähnlichkeiten zwischen dem *orf224* des pol-Cytoplasmas und dem *orf222* des nap-Cytoplasmas von *Brassica napus* oder dem *orf79* vom Reis (Bo-Cytoplasma) und dem *orf107* des A3-Cytoplasmas von *Sorghum bicolor* (zusammengefasst in SCHNABEL UND WISE, 1998). Die CMS-Sequenzen sind vermutlich unabhängig voneinander durch zufällige Rekombinationsereignisse entstanden. Bei der TURF2H3-Sequenz im T-Cytoplasma vom Mais wird vermutet, daß mindestens sieben Rekombinationsereignisse zur Entstehung beitrugen (DEWEY et al., 1986). Da es wahrscheinlich eine Vielzahl verschiedener Rekombinationsmöglichkeiten gibt, würden solche Ereignisse selten an derselben Stelle auftreten. Dies würde die seltenen Homologien zwischen CMS-Sequenzen erklären.

Da das CMS 1.1-Fragment eine chimere Sequenz hat, ist anzunehmen, daß sie Teil des sterilitätsbedingenden offenen Leserasters von *Allium schoenoprasum* L. ist. Um dies zu beweisen muß die gesamte CMS-Sequenz isoliert und sequenziert werden. Danach kann anhand der Basenfolge festgestellt werden, ob diese Sequenz für das 18 kDa CMS Protein kodiert. Dies ist möglich, indem die Anzahl der Basen zwischen Start- und Stopkodon ermittelt wird. So lassen sich Rückschlüsse auf das Molekulargewicht des Proteins ziehen. Außerdem kann die Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt werden, so daß mit Hilfe von Computerprogrammen eine Untersuchung der Struktur des Polypeptids möglich ist. Da viele CMS assoziierte Gene die gemeinsame Eigenschaft haben, große hydrophobe Domänen zu kodieren (LEVINGS, 1993), ist dies auch für die Struktur des Proteins zu erwarten. Von der Struktur des Proteins könnten

noch weitere Hinweise für die Funktion gefunden werden (STRYER, 1995). Sind die CMS-Proteine wie beim T-Cytoplasma des Mais (DEWEY et al., 1987) und bei dem PET1-Cytoplasma der Sonnenblume (HORN et al., 1991; MONEGER et al., 1994) Teile der Mitochondrienmembran, könnten diese hydrophoben Bereiche membrandurchspannende Strukturen sein.

Die einfachste Methode das 5'-Ende der Sequenz zu finden ist die sogenannte „Race-PCR“. Dabei wird zunächst mitochondriale Gesamt RNA isoliert. Anschließend wird mit Hilfe eines genspezifischen Primers eine Reverse Transkription durchgeführt. Das mRNA Template wird anschließend mit RNase H verdaut. Nach Reinigung der cDNA wird an das 3'-Ende der Sequenz ein Adapter angehängt. Anschließend wird das Fragment mit Hilfe eines PCR-Primers, der an den Adapter anlagert, und einem zweiten genspezifischen Primer amplifiziert. Nach Auftrennung, Isolierung, Klonierung und Transformation kann das Fragment sequenziert werden. Das 3'-Ende des Locus könnte dann anschließend durch das „Chromosom walking“ isoliert werden (WATSON et al., 1993). Dabei wird zunächst mitochondriale DNA partiell restringiert. Die entstandenen Fragmente werden in einen Vektor kloniert und danach beispielsweise in *E. coli* eintransformiert oder als  $\lambda$ -Phagen verpackt. Die so entstandene mitochondriale DNA Bank wird mit dem CMS 1.1-Fragment, das als Sonde eingesetzt wird, gescreent. So werden die Klone identifiziert, die eine mitochondriale Sequenz tragen, die einen Teil oder das ganze CMS 1.1-Fragment beinhaltet. Solche Fragmente werden anschließend sequenziert und mit der Sequenz des CMS 1.1-Fragmentes verglichen. Unbekannte Sequenzen, die das CMS 1.1-Fragment flankieren, werden anschließend wieder als Sonde zum screenen der mitochondrialen DNA-Bank eingesetzt. So wird die Gesamtsequenz nach und nach zusammengesetzt. Im Vergleich zu der „Race-PCR“ ist das „Chromosome walking“ zeit- und arbeitsaufwendiger.

Bei der Untersuchung von Pflanzen, die durch das *T*-oder das *X*-Gen restoriert wurden, stellte sich heraus, daß die mit dem CMS 1-Marker gekoppelte Sequenz auch in den restorierten Individuen vorkommt. Es kann also ausgeschlossen werden, daß die CMS-Sequenz durch die Wirkung der Restorerogene aus dem mitochondrialen Genom eliminiert wird, wie das bei *Phaseolus vulgaris* der Fall ist. Untersuchungen von HE et al. (1995) zeigten, daß das *Fr*-Restorerogen, jedoch nur wenn es homozygot dominant vorliegt, eine

210 kb große zirkuläre mitochondriale DNA, die die sterilitätsbedingende *pvs*-Sequenz von *Phaseolus vulgaris* beinhaltet, aus dem Chondriom restorierter Pflanzen eliminiert. Die Restoration durch das *Fr*-Gen ist irreversibel. Wirkt bei den Pflanzen das *Fr2*-Restorer-gen, bleibt die 210 kb große zirkuläre DNA trotz der Restoration erhalten. ABAD et al. (1995) fanden heraus, daß das *Fr2*-Gen posttranskriptional wirkt. Da auch bei *Allium schoenoprasum* L. die mit dem CMS-Marker gekoppelte Sequenz in restorierten Pflanzen erhalten bleibt, ist hier wahrscheinlich auch eine posttranskriptionale Regulation wirksam. Ein weiterer Hinweis hierfür ist die Untersuchung der Restoration durch das *X*-Gen. Potz und Tatlioglu (1993) zeigten, daß das sterilitäts-assoziierte 18 kDa Protein in solchen Pflanzen im Gegensatz zu sterilen nicht vorkommt. Deshalb ist eine posttranslationale Regulation wahrscheinlich auszuschließen. GAGLIARDI und LEAVER (1999) postulieren eine posttranskriptionale Regulation beim PET1-Cytoplasma der Sonnenblume. Sie fanden heraus, daß in restorierten Pflanzen das dicystronische *atpA-orfH522*-Transkript durch das Anhängen eines Poly-A-Schwanzes destabilisiert wird. Dies scheint ein Signal für bestimmte RNasen zu sein, die diese Transkripte bevorzugt abbauen. Solche Poly-A-spezifischen RNasen wurden auch in Kartoffelmitochondrien nachgewiesen (GAGLIARDI und LEAVER, 1999) und könnten so ein Hinweis auf den allgemeinen Abbauweg von pflanzlicher mitochondrialer mRNA sein. Durch Transkriptionsanalysen könnte auch bei *Allium schoenoprasum* L. herausgefunden werden, ob solch eine posttranskriptionale Regulation stattfindet.

# 3 Untersuchung mitochondrialer Translationsmuster bei CMS und GMS im Vergleich zu fertilen Pflanzen

## 3.1 Einleitung

Die CMS wird maternal vererbt und hat zur Folge, daß die Pflanze keinen befruchtungsfähigen Pollen bilden kann. Dabei wird die weibliche Fertilität nicht beeinträchtigt (CHAUDHURY, 1993). Die CMS kommt in vielen Pflanzenspezies vor und entsteht meist durch Umorganisationen des mitochondrialen Genoms, bei denen oft chimere offene Leseraster bzw. unbekannte Leseraster entstehen. In vielen Fällen werden diese Leseraster transkribiert und durch deren Translation entstehen einzigartige Proteine, die die mitochondriale Funktion und die Pollenentwicklung beeinflussen. Restorerogene (*Rf/rf*), die im Kern lokalisiert sind, können diesen Effekt aufheben, so daß die Pflanze pollenfertil ist.

Die Proteine, die mit der CMS korreliert sind, können mit *in organello*-Translationen sichtbar gemacht werden. Bei dieser Methode werden intakte Mitochondrien isoliert, und nach Zugabe von radioaktiven und nicht radioaktiven Aminosäuren sowie einer Energiequelle synthetisieren diese nur die mitochondrialen Proteine weiter. Nach Auftrennung der Polypeptide mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie werden die Translationsmuster sichtbar. Auf diese Weise konnte unter anderem beim (T)-Sterilitätszytoplasma vom Mais ein zusätzliches CMS-spezifisches Polypeptid nachgewiesen werden, das ein Molekulargewicht von 13 kDa hat. Es wird nicht in anderen Cytoplasmatypen gebildet und ist in restorierten Pflanzen um etwa 80 % reduziert (FORDE et al., 1978, FORDE und LEAVER, 1980). Die fertilen Pflanzen haben dagegen ein 21 kDa Polypeptid, das im (T)-Sterilitätszytoplasma nicht vorkommt (FORDE und LEAVER, 1980). Weitere Untersuchungen zeigten, daß das

13 kDa Protein im (T)-Sterilitätscytoplasma vom *turf13* kodiert wird (DEWEY et al., 1986; WISE et al., 1987).

Auch bei anderen Pflanzen führte die Anwendung dieser Methode zur Identifikation von mitochondrialen Proteinen, die nur in CMS-Pflanzen vorkommen: bei der Sonnenblume wurde ein 16 kDa Protein gefunden, das nur in den sterilen und restorierten Pflanzen vorhanden war (HORN et al., 1991). Später konnte nachgewiesen werden, daß der *orfH522*, der in der Nähe des *atpA*-Gens lokalisiert ist, dieses 16 kDa Protein kodiert (KÖHLER et al., 1991).

Analysen der mitochondrialen Translationsmuster vom Schnittlauch führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. POTZ und TATLIOGLU (1993) fanden bei der Untersuchung des (S)-Sterilitätscytoplasmas ein 18 kDa Polypeptid, das CMS-spezifisch ist und dessen Synthese durch das dominante Restorerger *X/x* unterdrückt wird. SCHNEIDER und TATLIOGLU (1994, 1996a) dagegen fanden dieses 18 kDa Protein sowohl in sterilen als auch in fertilen Pflanzen, jedoch in unterschiedlicher Quantität: sterile Pflanzen bilden mehr von diesem 18 kDa Protein als fertile. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit weitere *in organello*-Translationen durchgeführt und anschließend die mitochondrial kodierten Proteine von fertilen und sterilen Pflanzen verglichen. Bei der Untersuchung der CMS 2 von *Allium schoenoprasum* L. fand ENGELKE (1999) ein weiteres Protein, das nur im (S2)-Sterilitätscytoplasma vorkommt und dessen Molekulargewicht 16,8 kDa beträgt. Außerdem wurde im Normalcytoplasma ein 17,8 kDa Protein gefunden, das in den CMS 2 Pflanzen fehlt, und ein Polymorphismus im ATP9-Protein, das bei sterilen Pflanzen größer ist, als bei fertilen. Bislang konnte jedoch für beide sterilitäts-korrelierte Proteine kein offenes oder unbekanntes Leseraster identifiziert werden, das diese kodiert. Lediglich bei der CMS 1 wurde eine chimere Sequenz gefunden, die mit der CMS korreliert ist. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, daß es sich dabei um das das 18 kDa Protein kodierende offene Leseraster handelt (siehe Kapitel 2).

Zudem sollten Untersuchungen der *St1/st1*-GMS durchgeführt werden, denen die Fragestellung zu Grunde lag, ob auch die GMS-Gene mit den Mitochondrien

interagieren, indem die Expression mitochondrialer Gene oder die Genomorganisation beeinflusst wird.

Solche Untersuchungen wurden zuvor an *Nicotiana sylvestris* und der Wilau-GMS bei *Allium schoenoprasum* L. durchgeführt. Bei *Nicotiana sylvestris* wurde ein Polymorphismus im Translationsmuster von sterilen und fertilen Pflanzen gefunden, der dem zuvor bei CMS-Pflanzen gefundenen gleicht (DE PAEPE et al., 1990). Bei der Wilau-GMS von *Allium schoenoprasum* L. zeigte sich nach *in organello*-Translationen kein Unterschied im mitochondrialen Proteinmuster zwischen sterilen und fertilen Pflanzen (ENGELKE, 1999).

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Pflanzenmaterial

Für die *in organello*-Synthesen wurden Einzelpflanzen der Linie 10053 verwendet, die bezüglich des GMS-Gens *St1/st1* spalten und bei denen das Normalcytoplasma (N2) vorliegt. Diese wurden zudem mit fertilen Pflanzen der Linien 11013 und 11038, die die Normalcytoplasmen (N1) bzw. (N2) tragen, verglichen. Weiterhin sind Einzelpflanzen der Linien 6025 und 2010 verwendet worden, die das Sterilitätszytoplasma (S) tragen. In der Linie 6025 spaltet das Gen für die Temperatursensitivität (*T*: temperatursensitiv, *t*: temperaturinsensitiv), das Restorerger *X/x* ist rezessiv und die Pflanzen sind tetracyclininsensitiv (dominantes *A*-Gen). Die untersuchte Pflanze der Linie 2010 dagegen trägt das rezessive Restorerger *X/x*, ist tetracyclininsensitiv (*a*) und temperaturinsensitiv (*t*).

In Tabelle 3.1 sind die Einzelpflanzennummern, deren jeweiliger Genotyp und der resultierende Phänotyp angegeben. Die Pflanzen der Linien 6025 und 2010 wurden bei Temperaturen von 20 °/12 °C (Tag/ Nacht) kultiviert, um eine Restorierung durch das *T*-Gen zu vermeiden.

Um bakterielle Kontaminationen während der Mitochondrien-Isolation zu vermeiden, waren die Pflanzen zuvor *in vitro* aufgenommen und kultiviert worden (ENGELKE, 1999; WEIBKORN, persönliche Mitteilung).



**Tab. 3.1:** Pflanzenmaterial zur Charakterisierung der mitochondrial kodierten Proteine

<b>Pflanzennummer</b>	<b>Cytoplasma- und Genotyp</b>	<b>Phänotyp</b>
10053/18	(N2) st1 st1	steril
10053/14	(N2) St1 St1	fertil
11013/11	(N1)	fertil
11038/8	(N2)	fertil
6025/21	(S) xxA.tt	steril
6025/23	(S) xxA.tt	steril
6025/74	(S) xxA.tt	steril
6025/22	(S) xxA.T.	steril
6025/26	(S) xxA.T.	steril
6025/60	(S) xxA.T.	steril
6025/64	(S) xxA.T.	steril
2010/9	(S) xxaaT.	steril

Um bakterielle Kontaminationen während der Mitochondrien-Isolation zu vermeiden, waren die Pflanzen zuvor *in vitro* aufgenommen und kultiviert worden (ENGELKE, 1999; WEIßKORN, persönliche Mitteilung).

### **3.2.2 *In organello*-Translationen**

#### **Isolierung intakter Mitochondrien**

Zur Isolierung von Mitochondrien wurde eine abgeänderte Methode von BOUTRY et al. (1984) angewendet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt, dazu benötigte Gefäße und Lösungen wurden autoklaviert und vorgekühlt. Die Isolierung erfolgte aus 8,5 g Wurzeln oder 9 g Blättern, die von *in vitro*-Pflanzenmaterial geerntet worden sind, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Das Pflanzenmaterial wurde bis zur Weiterverarbeitung in 50 ml Homogenisierungspuffer gelagert. Anschließend wurde es durch dreimaliges Mörsern in insgesamt 200 ml Homogenisierungspuffer

aufgeschlossen. Nach jedem Mörserschritt wurde das Homogenisat durch zwei Lagen in Miracloth (Fa. Calbiochem) eingeschlagene Milchfilter in Zentrifugenbecher filtriert. Anschließend folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 3500 x g, um unerwünschte Zellbestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde in einen neuen Zentrifugenbecher überführt. Die Mitochondrien sind durch einen weiteren 25 minütigen Zentrifugationsschritt bei 17000 x g pelletiert worden. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit einem Pinsel in 1,6 ml 1 x Resuspensionspuffer aufgenommen und im Potter-Homogenisator homogenisiert. Eine anschließende Percoll-Dichtegradienten Ultrazentrifugation (45 min, 70000 x g) trennte die Mitochondrien von den restlichen Zellbestandteilen. An der Grenze zur 45 % Phase des Dichtegradienten bilden die Mitochondrien eine Bande. Diese Bande wurde mit einer Pasteurpipette entnommen. Zur Entfernung des Percolls sind zwei Waschschriffe in je 25 ml 1 x Resuspensionspuffer durchgeführt worden. Nach dem ersten Waschschriff folgte eine 25 minütige Zentrifugation bei 15000 x g und nach dem zweiten eine 15 minütige Zentrifugation bei ebenfalls 15000 x g. Das Pellet wurde in 1 ml 1 x Resuspensionspuffer aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Mitochondrien wurden dann 8 min bei 10000 x g pelletiert und in 100 µl 1 x Resuspensionspuffer aufgenommen.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

#### **Homogenisierungspuffer**

0,4 M Mannit  
 25 mM MOPS  
 1 mM EDTA  
 0,1 % BSA  
 0,1 % Polyvinyl-Pyrrolidon  
 (PVP 40)  
 10 mM β-Mercaptoethanol  
 pH 7,8 mit KOH eingestellt

#### **2 x Resuspensionspuffer**

0,8 M Mannit  
 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH 7,2 mit KOH eingestellt

#### **Percoll-Gradient**

(durch Unterschichtung mit einer 10 ml Pipette)

14 % Percoll  
 26 % Percoll  
 45 % Percoll

Die Verdünnung des Percolls erfolgte mit 2 x Resuspensionspuffer und Aqua dest.

### **Radioaktive *in organello*-Translation**

Die *in organello*-Translation wurde nach einem abgeänderten Protokoll von LEAVER et al. (1983) durchgeführt. Hierbei wurde die Aminosäurekonzentration im Vergleich zu dem ursprünglichen Protokoll erhöht (LIND et al. 1991) und neben  $^{35}\text{S}$ -Methionin auch  $^{35}\text{S}$ -Cystein eingesetzt (SCHNEIDER und TATLIOGLU 1996b). Die Mitochondriensuspension von 100  $\mu\text{l}$ , die nach der Isolation intakter Mitochondrien zur Verfügung standen, wurde in zwei 50  $\mu\text{l}$  Aliquots geteilt. Es wurden 150  $\mu\text{l}$  Inkubationsmix, der alle Aminosäuren enthielt, und 50  $\mu\text{l}$  Energiemix in jede Probe pipettiert und diese anschließend für 90 min bei 25 °C in einem Wasserbad inkubiert. Der Inkubationsmix und der Energiemix sind getrennt angesetzt und eingefroren worden. Dies ermöglichte eine Variation der Energiequellen und den Zusatz von Antibiotika. Vor den *in organello*-Translationen wurden dem Inkubationsmix die radioaktiv markierten Aminosäuren zugesetzt. Für den Energiemix wurde das Succinat jeweils frisch angesetzt und zu einer aliquotierten ADP-Stammlösung hinzugegeben. In Anschluß an die Inkubation wurde aus jeder Probe und vom Inkubationsmix 5  $\mu\text{l}$  entnommen und diese auf ein 1  $\text{cm}^2$  großes Whatman-Papier pipettiert, damit später die Bestimmung der inkorporierten Aktivität nach einer veränderten Methode von MANS und NOVELLI (1961) erfolgen konnte. Um die Proteine an das Whatman-Papier zu binden, wurden nach kurzer Lufttrocknung die Papierstücke für 1 min in 10 %iger (w/v) Trichloressigsäure mit 10 mM Methionin über Nacht inkubiert. Die Inkorporation ist nach Entnahme des 5  $\mu\text{l}$ -Aliquots durch Zugabe von einem ml Methioninpuffer gestoppt und die Mitochondrien sind durch fünfminütige Zentrifugation bei 15000 x g pelletiert worden. Es folgte die Entfernung des Überstandes und die Lagerung des Pellets bei -20 °C. Die Whatman-Papierstückchen wurden am nächsten Tag mehreren Waschschrinen unterzogen: 15 min bei Raumtemperatur, 30 min bei 90 °C und 15 min bei Raumtemperatur, jeweils in 5 %iger Trichloressigsäure. Anschließend wurden sie durch 30 minütige Inkubation bei 37 °C und 15 minütige bei Raumtemperatur jeweils in 99 %igem Ethanol dehydriert. Nach einstündiger Trocknung der Papierstücke und Überführung in 5 ml Scintillationscocktail (Fa. Roth) erfolgte eine Messung der inkorporierten Radioaktivität in einem Scintillationszähler (Fa. Beckmann). Die Messung des Inkubationsmix-Aliquots diente hierbei zur Ermittlung der Hintergrundstrahlung. Die Berechnung des Endwertes für den Einbau der Radioaktivität in der Probe erfolgte unter Berücksichtigung des gesamten Volumens. Dabei wurden die Meßwerte der Proben, die

Mitochondrien enthielten, mit dem Faktor 50 und der Meßwert für die Hintergrundstrahlung mit 30 multipliziert.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

#### **Inkubationsmix**

(Endkonzentration nach Zugabe von Mitochondrien und Energiemix)

250 mM Mannit  
 90 mM KCl  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM Tricin  
 1 mM EGTA  
 5 mM Kaliumphosphatpuffer  
 2 mM DTT  
 1 mM GTP

pH 7,2

je 250µM 20 nichtradioaktive

Aminosäuren

1,3 MBq In vitro Cell Labelling Mix  
 (70 % <sup>35</sup>S-Methionin,  
 30 % <sup>35</sup>S-Cystein,  
 Fa. Amersham Pharmacia)

#### **Energiemix**

(Endkonzentration nach Zugabe von Mitochondrien und Energiemix)

10 mM Succinat  
 2 mM ADP

#### **Methioninpuffer**

0,4 M Mannit  
 10 mM Methionin  
 1 mM EGTA  
 10 mM Tricin

pH 7,2

#### **10 %ige Trichloressigsäure**

10% (w/v) Trichloressigsäure  
 10 mM Methionin

#### **5 %ige Trichloressigsäure**

5% (w/v) Trichloressigsäure

### **3.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung mitochondrialer Proteine**

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Mitochondrien in SDS-Extraktionspuffer aufgenommen, so daß 4-6 x 10<sup>5</sup> cpm inkorporierte Radioaktivität der Probe in 30 µl enthalten waren. Dazu wurden die zuvor pelletierten Proben in dem SDS-

Extraktionspuffer resuspendiert und für 30 min bei 40 °C inkubiert. Dem verwendeten Trennverfahren lagen Methoden von LAEMMLI (1970) und SCHÄGGER und VON JAGO (1991) zugrunde. In der neueren Methode wurden die Glycin-Puffer durch Tricin-Puffer ersetzt und damit wesentlich bessere Trennergebnisse im Bereich von 15 kDa erreicht, ohne zwei verschiedene Polyacrylamidgelsysteme, wie z.B. Polyacrylamidgele nach LAEMMLI (1970) und Harnstoffgele nach SCHÄGGER und VON JAGO (1987), einzusetzen.

Es wurden 20 cm x 20 cm x 0,75 cm Polyacrylamidgele verwendet, bei denen das Trenngel 16 cm und das daran anschließende Sammelgel 4 cm hoch waren. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Kammer der Firma Biorad für 1 h bei 30 V und ca. 14 h bei 110 V. Als Molekulargewichtsmarker diente dabei der Rainbow-Coloured Marker (low molecular weight range 2,35-46 kDa, Fa. Amersham Pharmacia). Anschließend wurden die Polyacrylamidgele für 30 Minuten in einer Fixierungslösung inkubiert und 5 h bei 60 °C in einem Vakuumtrockner dehydriert. Die Exposition von Fuji RX-Filmen erfolgte bei -80 °C für 2-14 Tage.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

#### **SDS-Extraktionspuffer**

100 mM Tris/HCl pH 6,8  
 30 % Glycerin (w/v)  
 4 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 0,02 % Serva blue G (w/v)

#### **Gelpuffer**

3 M Tris/HCl pH 8,45  
 0,3 % SDS (w/v)

#### **Trenngel**

12 % T/3 % C Polyacrylamid  
 10 ml Gelpuffer  
 4 g Glycerin  
 ad 30 ml Aqua dest  
 150  $\mu$ l 10 % Ammoniumpersulfat  
 (w/v)  
 15  $\mu$ l Temed

#### **Overlaylösung**

1 M Tris/HCl pH 8,45  
 0,1 % SDS (w/v)

**Sammelgel**

4 % T/3 % C Polyacrylamid

3,1 ml Gelpuffer

ad 12,5 ml Aqua dest

100  $\mu$ l 10 % Ammoniumpersulfat  
(w/v)10  $\mu$ l TEMED**10 x Anodenpuffer**

2 M Tris/HCl pH 8,9

**Kathodenpuffer**

0,1 M Tricin

0,1 % SDS (w/v)

0,1 M Tris

(pH 8,25, der pH-Wert ergibt sich aus  
der Pufferzusammensetzung)**Fixierlösung**

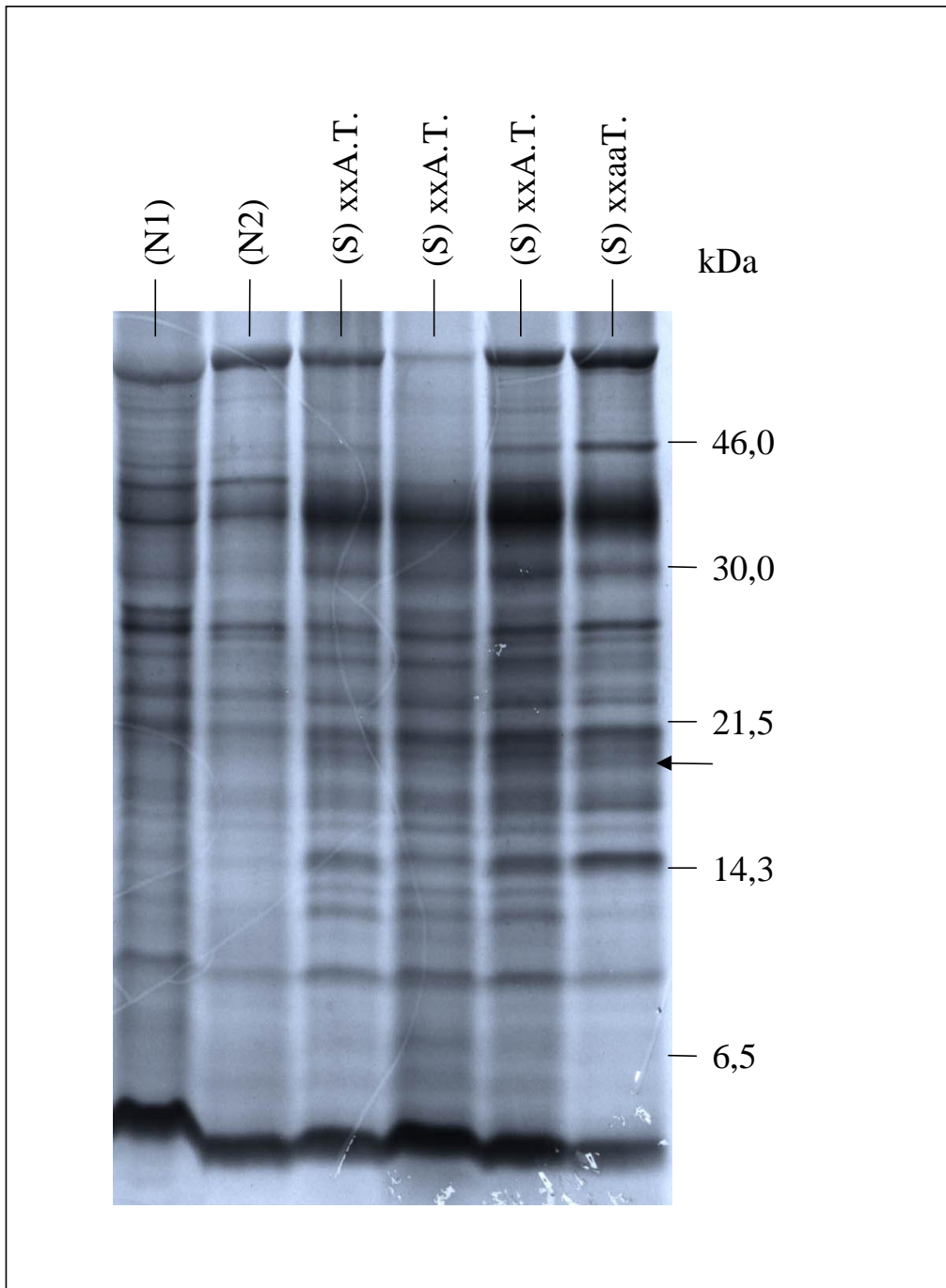
50 % Methanol (v/v)

10 % Essigsäure (v/v)

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Untersuchung der Translationsmuster von CMS 1 und fertilen Pflanzen

Frühere Untersuchungen der CMS 1 ergaben voneinander abweichende Ergebnisse. POTZ und TATLIOGLU (1993) fand, daß nur in Pflanzen mit dem Sterilitätscytoplasma (S) ein 18 kDa Protein auftrat, wohingegen SCHNEIDER und TATLIOGLU (1994, 1996a) dieses Protein sowohl bei sterilen als auch bei fertilen Pflanzen in unterschiedlicher Quantität fanden. Um diese Ergebnisse näher zu untersuchen, wurden erneut *in organello*-Translationen mit Pflanzen, die das Sterilitätscytoplasma (S) bzw. das Normalcytoplasma (N1) oder (N2) trugen durchgeführt. Die dazu benötigten Mitochondrien wurden aus Wurzeln von keimfreien *in vitro* Pflanzen isoliert, im Gegensatz zu POTZ (1992), die die Mitochondrien aus Knospen von Pflanzen aus dem Gewächshaus isolierte, und zu SCHNEIDER und TATLIOGLU (1994, 1996a), die die Mitochondrien aus einem Gemisch von keimfreien Blättern und Wurzeln isolierten. In Abbildung 3.1 ist ein Translationsmustervergleich zwischen sterilen und fertilen Pflanzen gezeigt. Die dabei untersuchten sterilen Pflanzen hatten an den Restorerloci im Kern zum Großteil die Zusammensetzung  $xxA.T$ . ( $x$ ,  $A$ : keine Restoration,  $T$ : Restoration wenn die Pflanzen bei hohen Temperaturen kultiviert werden). Nur die Pflanze 2010/9 hatte die Zusammensetzung  $xxaaT$ . ( $a$ : Restoration durch Besprühen mit Tetracyclin). Durch die Kultivierungsbedingungen wurde eine Restoration der CMS 1-Pflanzen unterbunden. In Pflanzen die das Sterilitätscytoplasma (S) trugen wurde ein 18 kDa Protein gefunden (Abbildung 3.1), das in Pflanzen mit Normalcytoplasma (N1) oder (N2) nicht vorhanden war. Somit konnte das Ergebnis von POTZ und TATLIOGLU (1993) bestätigt werden.

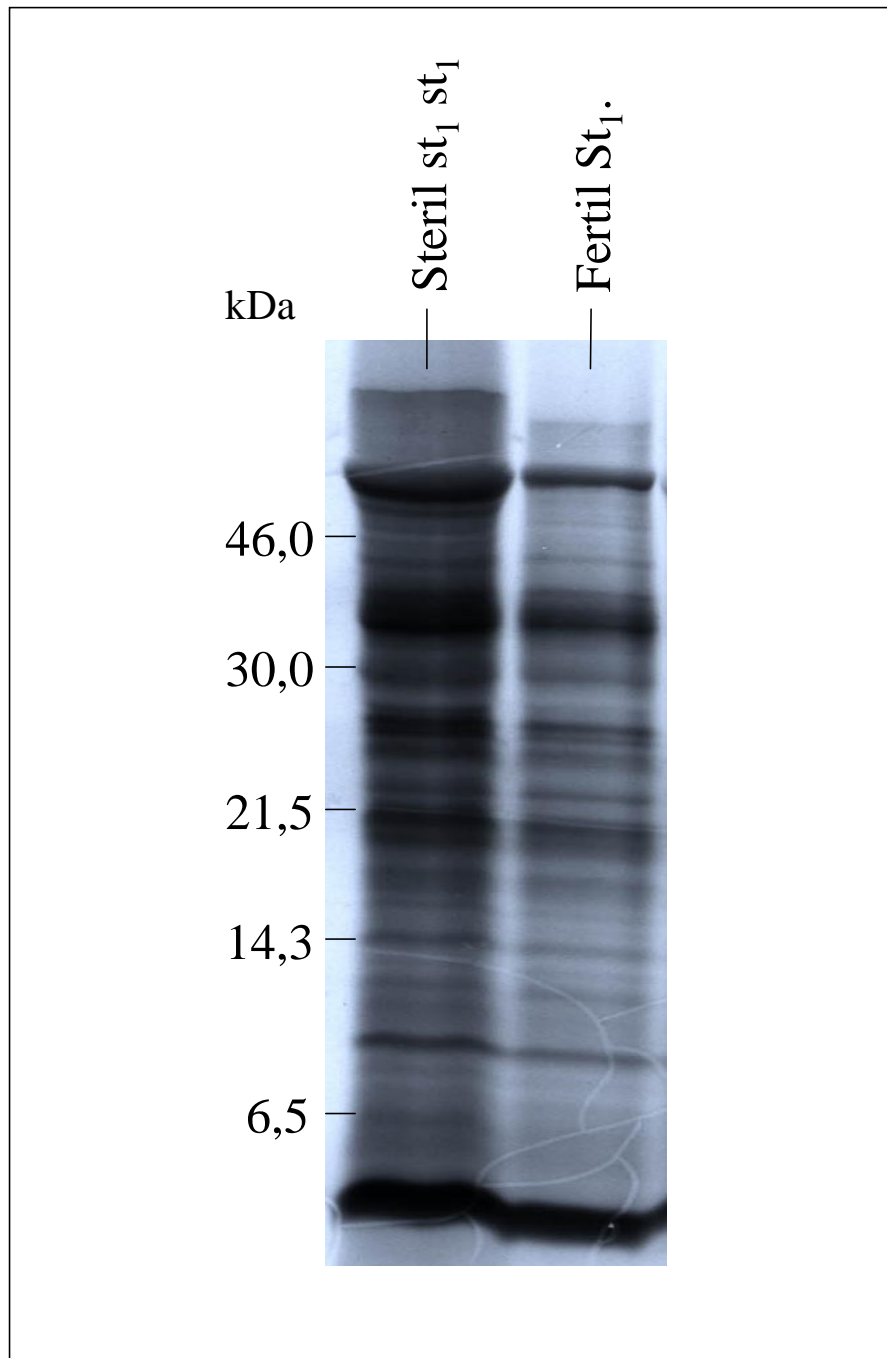


**Abb. 3.1:** Polymorphe mitochondriale Translationsprodukte im Sterilitätscytoplasma (S) im Vergleich zu den Normalcytoplasmen (N1) und (N2). Der Pfeil markiert das polymorphe 18 kDa Protein, das nur im Sterilitätscytoplasma (S) vorkommt. kDa bezieht sich auf den verwendeten Molekulargewichtsmarker (Rainbow Coloured Marker, 2,35-4,6 kDa).



### **3.3.2 Untersuchung der mitochondrialen Proteine von *St1/st1*-GMS und fertilen Pflanzen durch *in organello*-Translationen**

Das Vorhandensein des *St1/st1*-Gens im rezessivem Zustand ruft in den betroffenen Pflanzen männliche Sterilität hervor. Der Wirkort dieses GMS-Gens bzw. die Ursache für die männliche Sterilität ist nicht bekannt. Deshalb wurde mit Hilfe von *in-organello*-Translationen untersucht, inwiefern ein Einfluß des *St1/st1*-Gens auf die mitochondriale Proteinbiosynthese gegeben ist. In Abbildung 3.2 ist ein mitochondrialer Translationsmustervergleich zwischen einer sterilen und fertilen Pflanze dargestellt. Bei den untersuchten Pflanzen wurden die Mitochondrien aus sterilen Wurzeln isoliert, da in diesem Gewebe die Mitochondrienausbeute größer ist als im Laub. Beim Vergleich dieser Bandenmuster konnten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Pflanzen gefunden werden. Es konnte also kein Einfluß des *St1/st1*-Gens auf die mitochondriale Proteinbiosynthese nachgewiesen werden.



**Abb. 3.2:** *In organello*-Translationsmuster von einer st<sub>1</sub>-genisch männlich sterilen und einer fertilen Pflanze mit dem Cytoplasmatyp (N2). kDa bezieht sich auf den verwendeten Molekulargewichtsmarker (Rainbow Coloured Marker, 2,35-4,6 kDa).

### 3.4 Diskussion

Für die Charakterisierung der CMS 1 und der *St1/st1*-GMS wurden *in organello*-Translationen verwendet. Bei dieser Methode werden isolierten biologisch aktiven Mitochondrien eine Energiequelle und radioaktive sowie nicht radioaktive Aminosäuren zur Verfügung gestellt, wodurch nur mitochondrial translatierte Proteine radioaktiv markiert werden. Diese Vorgehensweise ermöglicht es mitochondriale und andere Proteine durch die radioaktive Markierung zu unterscheiden. Der Nachteil dieser Methode ist der hohe Arbeitsaufwand. Die Pflanzen, die analysiert wurden, mußten *in vitro* aufgenommen werden, denn bei Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus bzw. aus dem Freiland wurden immer wieder bakterielle Kontaminationen festgestellt. Steriles Auskeimen als Alternative zu *in vitro* Pflanzen ist bei *Allium schoenoprasum* L. nur bei Verfügbarkeit einer großen Saatgutmenge möglich, da Schnittlauch-Keimlinge nicht genügend Pflanzenmasse für eine Aufarbeitung bilden. Dadurch war die Isolierung der Mitochondrien nur aus sterilen Wurzeln und Laub der *in vitro* Kulturen möglich. Es zeigte sich, daß die Mitochondrienausbeute aus Wurzeln höher war als aus dem Laub. Vermutlich ist dies auf das schnelle Wurzelwachstum zurückzuführen, das viel Energie benötigt. Zudem war der Einbau der radioaktiven Aminosäuren bei den Mitochondrien aus Wurzeln stärker (650000-2000000 cpm) als beim Laub (weniger als 300000 cpm). ENGELKE (1999) erzielte vergleichbare Inkorporationsraten. In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, daß die verwendete Menge des Blattmaterials nicht gesteigert werden kann, da sonst im Percoll-Gradienten starke Schlieren in der oberen Phase entstanden, zum Teil eine Überladung des Gradienten erfolgte und keine Mitochondrienbande sichtbar war.

Das Sterilitätscytoplasma (S) der CMS 1 von *Allium schoenoprasum* L. und die Normalcytoplasmen (N1) und (N2) wurden mittels *in organello*-Translationsstudien untersucht. Dabei wurde ein 18 kDa Protein gefunden, das nur in sterilen Pflanzen vorkommt aber nicht bei fertilen (siehe Abbildung 3.1). Es wurde kein weiterer Protein-Polymorphismus gefunden. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von POTZ und TATLIOGLU (1993), die ebenfalls ein sterilitäts-assoziiertes 18 kDa Protein fanden.

SCHNEIDER und TATLIOGLU (1994, 1996a) untersuchten tetracyclinsensitive und außerdem temperatursensitive Pflanzen im Vergleich zu fertilen und restorierten. Dabei wurde das 18 kDa Protein bei allen analysierten Individuen gefunden, jedoch in unterschiedlicher Quantität: in einer fertilen Pflanze war weniger von dem 18 kDa Protein vorhanden als in einer sterilen. SCHNEIDER und TATLIOGLU (1994, 1996a) nahmen an, daß ein bestimmter Schwellenwert überschritten werden muß, damit die CMS 1 ausgeprägt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden sterile und fertile Pflanzen untersucht, jedoch keine restorierten. POTZ und TATLIOGLU (1993) analysierten sterile, fertile und durch das X-Gen restorierte Individuen, fanden jedoch das 18 kDa Protein nur in den sterilen. Diese und die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß das gefundene Protein sterilitäts-assoziiert ist, in restorierten Pflanzen nicht synthetisiert wird und in fertilen nicht vorhanden ist. Analysen mit dem sterilitäts-assoziierten Marker CMS 1 zeigten, daß die sterilitätsbedingende Sequenz in sterilen und restorierten Pflanzen vorhanden ist, in fertilen Pflanzen aber fehlt (siehe Abbildung 2.10 und 2.11). Obwohl durch diese Analysen nicht nachgewiesen werden konnte, daß die mit dem Marker gekoppelte CMS-Sequenz das 18 kDa Protein kodiert, stützen diese Ergebnisse die Untersuchungen von POTZ und TATLIOGLU (1993) und die vorliegenden Analysen, da bei den bekannten CMS-Systemen immer nur ein sterilitätsbedingendes offenes Leseraster gefunden wurde. Einige Beispiele hierfür sind der *T-urf13* des T-Cytoplasmas vom Mais (LEVINGS, 1993; WARD, 1995), der *orfH522*, der im PET1-Cytoplasma der Sonnenblume vorkommt (KÖHLER et al., 1991) oder auch das sterilitäts-assoziierte offene Leseraster bei *Brassica napus*, *Phaseolus vulgaris* und *Sorghum bicolor* (zusammengefasst in SCHNABEL UND WISE, 1998). Es liegt nahe, daß beim Schnittlauch ebenfalls nur ein sterilitäts-assoziiertes offenes Leseraster vorliegt, das wahrscheinlich mit der Sequenz identisch ist, die mit dem Marker gekoppelt ist. Diese Sequenz kommt nur in sterilen und restorierten Pflanzen vor, so daß bei fertilen Pflanzen das sterilitäts-assoziierte 18 kDa Protein nicht gebildet werden kann. Die restorierten Pflanzen sollten entweder auf RNA oder Protein Ebene erneut untersucht werden, da sowohl die Ergebnisse von POTZ und TATLIOGLU (1993) also auch die von SCHNEIDER und TATLIOGLU (1994, 1996a) in Bezug auf die untersuchten restorierten Individuen stimmen könnten, weil die mit dem Sterilitätsmarker gekoppelte Sequenz in restorierten Pflanzen vorhanden ist. Denkbar wäre hier, daß die unvollständigen Restorergene *a* und *T* anders wirken als das X-Gen, so daß bei den durch

*a*- oder *T*-Gen restorierten Pflanzen das untersuchte 18 kDa Protein in geringerer Quantität als bei den sterilen vorhanden sein könnte, wie es die Ergebnisse von SCHNEIDER und TATLIOGLU (1994,1996a) zeigen. Bei Individuen, die durch das *X*-Gen restoriert werden, könnte dagegen dieses Gen so in die Regulation eingreifen, daß das sterilitäts-assoziierte 18 kDa Protein nicht gebildet wird.

Der Vergleich der CMS 1 mit der CMS 2 zeigt, daß diese beiden Formen der männlichen Sterilität nicht identisch sind. ENGELKE (1999) fand bei der CMS 2 ein 16,8 kDa Protein, das nur im (S2)-Sterilitätscytoplasma vorkommt und ein 17,8 kDa Protein, das nur in den Normalcytoplasma (N1) und (N2) vorhanden ist. Außerdem wurde ein Polymorphismus beim ATP9-Protein gefunden, das bei CMS 2 Pflanzen größer ist (4,6 kDa) als bei fertilen (4,4 kDa, ENGELKE, 1999). Die Proteine, die im (S)- bzw. (S2)-Cytoplasma vorkommen, unterscheiden sich in ihrer Molekulargewichtsgröße. Ein Protein, das nur bei den fertilen Pflanzen auftritt, kommt bei der CMS 1 im Gegensatz zur CMS 2 nicht vor. Unterschiede in der Proteingröße bei zwei verschiedenen Sterilitätscytoplasmen einer Art sind nicht ungewöhnlich und kommen auch bei anderen CMS-Systemen vor. Bei *Brassica napus* kommt im pol-Cytoplasma ein 26 kDa Protein und im ogu-Cytoplasma ein 19 kDa Polypeptid vor. Bei *Sorghum bicolor* sind die Unterschiede im Molekulargewicht noch größer: im (A<sub>1</sub>)-Cytoplasma liegt ein 65 kDa Protein vor und im (A<sub>3</sub>)-Cytoplasma ein 11,85 kDa Polypeptid (zusammengefasst in SCHNABEL und WISE, 1998; ELKONIN und TYRNOV, 2000).

Die Markeruntersuchungen zeigten ebenfalls, daß die CMS-Sequenzen der CMS 1 und CMS 2 nicht identisch sind, da bei den PCR-Analysen im (S2)-Cytoplasma mit den S-Cytoplasma spezifischen Primern keinerlei Amplifikationen gefunden wurden. Eine Erklärung dafür wäre eine Mutation im Bereich der Primer, die zur Folge hat, daß ein oder beide Primer nicht mehr an die DNA binden können und bei PCR-Untersuchungen der CMS 2 kein Amplifikat entsteht. Eine eventuelle Homologie zwischen der CMS 1-Markerbande und einem sterilitäts-assoziierten Bereich bei der CMS 2 könnte mittels Southern-Hybridisierungen des CMS 1.1 Fragments mit DNA von CMS 2 Pflanzen untersucht werden.

Der Nutzung der GMS zur Erzeugung von Hybridsaatgut sind Grenzen gesetzt, da die Erhaltung der Mutterlinie (siehe Kapitel 1) durch Kreuzung mit einer am *St1/st1*-Locus heterozygoten Vaterlinie zu einer spaltenden Nachkommenschaft führt. Anwendung findet die GMS bei der Hybridsaatgut-Produktion hauptsächlich bei Zierpflanzen, besonders wenn die männliche Sterilität durch eine Umwandlung der Antheren in Blütenblätter bedingt ist und somit Blütenfüllung erreicht werden kann. ENGELKE UND TATLIOGLU (2000c, ENGELKE 1999) wies bei *Allium schoenoprasum* L. nach, daß das Gen *St1/st1* genisch männliche Sterilität bedingt, da es in den vier Cytoplasmen (N1), (N2), (N3) und (S2) ausgeprägt wird, die sich bezüglich der Organisation ihrer mitochondrialen Gene unterscheiden. Ein cytoplasmatischer Erbfaktor konnte somit folglich ausgeschlossen werden. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde der Einfluß der *St1/st1*-GMS-Gene auf die Mitochondrien mittels *in organello*-Translationsstudien analysiert. Beim Vergleich der Translationsmuster wurden keine Unterschiede gefunden. Solche Untersuchungen wurden zuvor nur an genisch männlicher Sterilität bei *Nicotiana sylvestris* (DE PAEPE et al., 1990) und *Allium schoenoprasum* L. (Wilau-GMS, ENGELKE, 1999) durchgeführt. DE PAEPE et al. (1990) zeigte durch *in organello*-Translationsstudien, daß männlich steril blühende Regenerate aus Protoplastenkultur ein mitochondriales Proteinmuster zeigen, daß sich von den fertilen Ausgangspflanzen unterscheidet aber dem zuvor bekannter CMS-Pflanzen gleicht. Untersuchungen der mitochondrialen Genomorganisation der männlich sterilen Regenerate und der Ausgangspflanzen ergaben keine Unterschiede, so daß die sterilen Pflanzen der GMS zugeordnet wurden. Ein klassisch genetischer Nachweis fehlt bei DE PAEPE et al. (1990) jedoch. ENGELKE und TATLIOGLU (1996a, 1996b, 2000b, 2000c) zeigten in Untersuchungen des mitochondrialen Genoms durch Hybridisierung mit mitochondrialen Sonden, daß die Organisation der mitochondrialen DNA bei fertilen und GMS-Pflanzen nicht unterschieden werden können. Anschließend *in organello*-Translationen von Pflanzen mit dem rezessiven *wi*-Gen und fertilen zeigten keinen Unterschied beim Vergleich von Proteinmustern der sterilen und fertilen Pflanzen. Die Ergebnisse der Untersuchung der Wilau-GMS und die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der *St1/st1*-GMS stimmen also überein. Sie zeigten, daß die mitochondrialen Proteinmuster nicht durch die GMS-Gene beeinflußt werden. Eine weitere Möglichkeit

zur Erklärung der männlichen Sterilität wäre eine Beeinflussung der kernkodierten mitochondrialen Proteine. Dieser Nachweis wäre durch die Untersuchung der gesamten mitochondrialen Proteine möglich, beispielsweise durch zwei dimensionale Elektrophorese.

Außerdem könnte das *St1/st1*-GMS-Gen direkt oder indirekt in die Mikrosporogenese eingreifen und so zur Pollensterilität führen. Um den Wirkort und die Wirkungsweise besser untersuchen zu können, ist es erforderlich, ein GMS-Gen zu isolieren und zu identifizieren.

# 4 Arbeiten zur Isolierung des Wilau-GMS Kerngens

## 4.1 Einleitung

Der Erforschung der GMS wurde im Gegensatz zu der CMS, die in der Hybridsaatgutproduktion Anwendung findet, wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Obwohl bekannt ist, daß die GMS-Gene meist im rezessiven Zustand zu Pollensterilität führen, konnte bislang nicht geklärt werden, wo ihr Wirkort ist und wie sie funktionieren. DE PAEPE et al. (1990) wiesen bei *Nicotiana sylvestris* zwar einen Einfluß des GMS-Gens auf die mitochondrialen Translationsmuster von sterilen Pflanzen nach, jedoch konnte dieses Ergebnis für den Schnittlauch nicht bestätigt werden. ENGELKE (1999) zeigte, daß das *Wi/wi*-Gen keinen Einfluß auf die Proteinbiosynthese der Mitochondrien hat und auch bei der *St1/st1*-GMS konnten keine Veränderungen der Polypeptid-Bandenmuster festgestellt werden (Kapitel 3.3.2).

Eine Einschränkung der Wirkorte der GMS-Gene beim Schnittlauch konnte durch mikroskopische Untersuchung der Mikrosporogenese-Stadien erzielt werden. Im Vergleich zu fertilen Pflanzen zeigten die sterilen Pflanzen, die das Wilau-Gen trugen, folgende Veränderungen: im Tetradenstadium wird kein Sporopollenin für die Exine gebildet, das Tapetum fängt an, sich stark zu vergrößern und ungewöhnliche dunkle Einschlüsse sowie Vakuolen zu bilden, die Kallose des Tetradenstadiums wird zwar abgebaut, jedoch entwickeln sich die Mikrosporen nicht weiter und das Tapetum löst sich von der Antherenwand und verkümmert (ENGELKE, 1999). Einige Parallelen konnten auch bei der *St1/st1*-Sterilität gefunden werden: auch hier wird kein Sporopollenin für die Exine gebildet, das Tapetum beginnt sich durch Vakuolenbildung stark zu vergrößern und von der Antherenwand abzulösen, die Kallosewand wird im Tetradenstadium nicht abgebaut, das Tapetum und die Mikrosporen bleiben schließlich im Zentrum der fast leeren Anthere liegen, jedoch sind die äußeren Zellwandschichten, Epidermis und Endothecium normal entwickelt (ENGELKE, 1999). Diese Untersuchungen zeigen, daß die *Wi/wi*- und *St1/st1*-



Gene vermutlich nicht an derselben Stelle in die Mikrosporogenese eingreifen und damit auch verschiedene Wirkungen hervorrufen (ENGELKE, 1999). Um jedoch diesen Mechanismus aufklären zu können, ist es wichtig, GMS-Gene zu isolieren.

Einen Einblick in die Wirkungsweise von männlicher Sterilität wurde durch die sogenannte gentechnisch induzierte männliche Sterilität möglich. MARIANI et al. (1990, 1992) entwickelten das Seedlink<sup>TM</sup>-System. Dabei wird die Barnase, eine RNase aus *Bacillus amyloliquefaciens*, unter die Kontrolle eines Tapetum-spezifischen Promotors gestellt. Dieses Konstrukt ist in Tabak eintransformiert worden. Es wurde nachgewiesen, daß die Transformanten männlich steril sind, wobei die weibliche Fertilität nicht beeinflußt wird. Das chimere Gen zerstört selektiv das Tapetum während der Antherenentwicklung und blockiert so die Pollenentwicklung. In die Vaterlinie wird ein weiteres Konstrukt eintransformiert, bestehend aus einem Tapetum-spezifischen Promotor der das *barstar*-Gen kontrolliert. Barstar wird in der Bakterienzelle als Schutz vor den letalen Effekten der Barnase gebildet. Treffen die Barnase und das Barstar Protein zusammen, formen sie einen stabilen Komplex und die RNase wird inaktiviert. Werden die männlich sterilen Mutterlinien mit der transformierten Vaterlinie gekreuzt, so sind die Nachkommen fertil.

KRIETE et al. (1996) entwickelten einen gentechnischen Sterilitätsmechanismus bei dem nur der mütterliche Kreuzungspartner transformiert werden muß. Das Transgen *argE* wird nach der Induktion durch von außen appliziertes N-acetyl-Phosphinothricin (N-ac-Pt) in den Tapetumzellen exprimiert, führt zum Zelltod und somit zur Pollensterilität. Diese Beispiele zeigen, daß ein Eingriff in die Mikrosporogenese die Pollenentwicklung unterbindet.

Um die Wirkungsweise eines GMS-Gens erforschen zu können, wurde versucht das *Wi/wi*-Gen mittels „Differential Display Reverse Transcription-PCR“ (DDRT-PCR, LIANG und PARDEE, 1992) zu isolieren. Bei dieser Methode werden Transkriptionsmuster von männlich sterilen und fertilen Pflanzen sichtbar gemacht und miteinander verglichen. Anschließend werden polymorphe Fragmente reamplifiziert, kloniert und als Sonde bei RFLP-Analysen eingesetzt.

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Pflanzenmaterial

Für die Isolierung der RNA wurden Pflanzen der Linie 11013 verwendet. Diese Linie ist Träger des Normalcytoplasmas (N1). Die sterilen Pflanzen sind am *Wi/wi*-Locus homozygot rezessiv. Die Linie 11013 entstand durch die Selbstung der Pflanze 10018/15, die am *St1/st1*-Locus heterozygot ist. Die daraus entstandene Linie 11013 spaltet im Verhältnis 3:1 fertil zu steril. Bei den verwendeten Fertilen wurde durch Testkreuzungen (Selbstungen) nachgewiesen, daß sie homozygot dominant sind. Vor der Entnahme der noch geschlossenen Knospen, wurde die erste geöffnete Blüte bonitiert. Es wurden zwei Pools gebildet. Der eine bestand aus fünf fertilen, der andere aus fünf sterilen Pflanzen dieser Linie. Die Knospen wurden in Stickstoff gefroren und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

Für die RFLP-Analysen wurden ebenfalls Pflanzen der Linie 11013 verwendet, aus denen DNA isoliert wurde. Die in diesen Untersuchungen verwendeten Pflanzen und ihre Bezeichnung, die ihrer Bonitur entspricht, sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

**Tab. 4.1:** Bonitur der Pflanzen, die für die RFLP-Analysen benutzt wurden.

<b>Steril / Fertil</b>	<b>Pflanzennummer</b>
fertil 1	11013/74
fertil 2	11013/92
steril 1	11013/22
steril 2	11013/32

### 4.2.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus jungen Blütenknospen erfolgte mit dem RNeasy Plant Kit (Fa. Qiagen) nach einem Protokoll dieser Firma. Durch einen 60 minütigen DNase-

Verdau bei 25 °C wurden verbliebene DNA-Reste entfernt. Der Ansatz von 100 µl setzte sich dabei wie folgt zusammen:

150	µg	RNA
50	mM	Tris/HCl pH 8,3
75	mM	KCl
3	mM	MgCl <sub>2</sub>
60	U	DNase I (Fa. Gibco BRL)
200	U	RNAse Out (Fa. Gibco BRL)

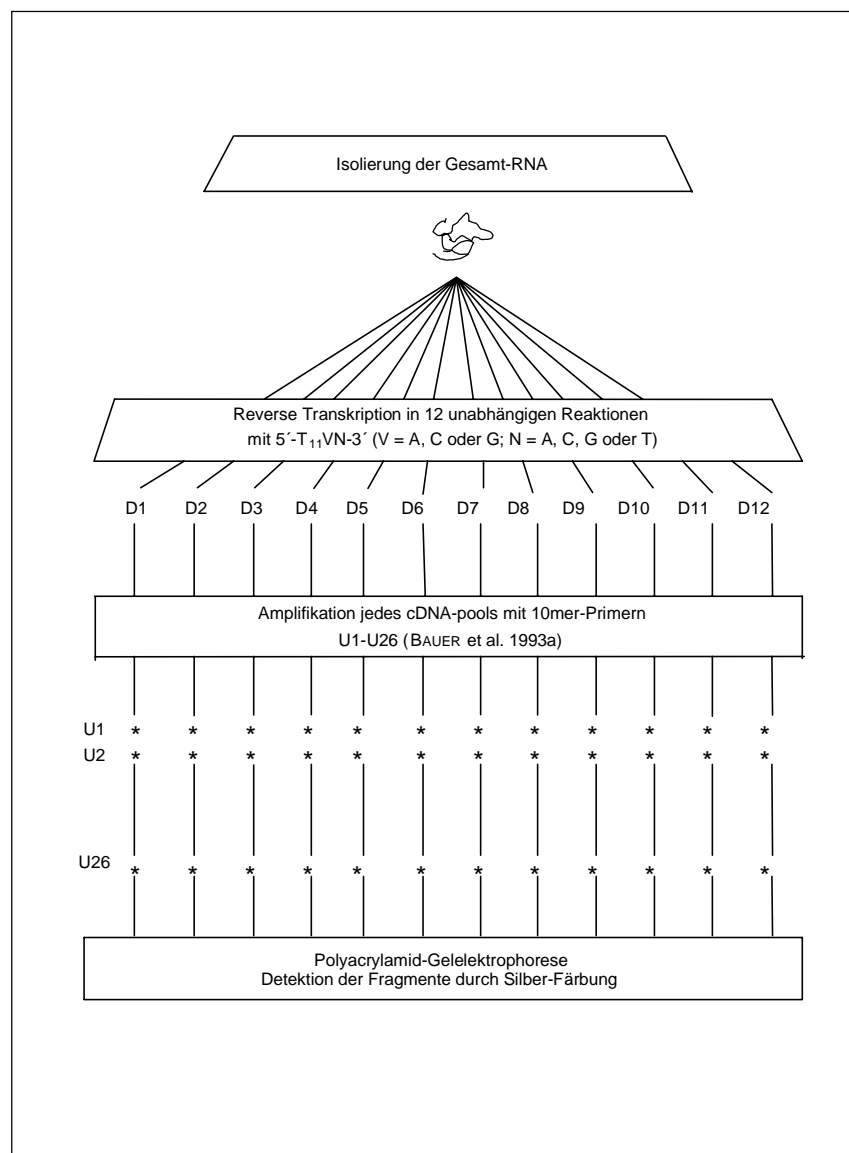
Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Zugabe von einem Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1), eine 15 minütige Zentrifugation bei 5000 x g und die Überführung der oberen wässrigen Phase in ein neues Gefäß. Zu dieser wurde ein Volumen Chloroform pipettiert. Durch eine erneute Zentrifugation (15 min bei 5000 x g) bildeten sich zwei Phasen aus, von denen wiederum die obere entnommen worden ist. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol,  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M NaAcetat, einer Inkubation über Nacht bei -20 °C und einer 30 minütigen Zentrifugation bei 13000 x g wurde die RNA präzipitiert. Das Pellet ist mit 70 %igem Ethanol gewaschen worden und erneut für fünf Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend im Vakuum getrocknet und in Aqua bidest. resuspendiert. Die Bestimmung des RNA-Gehaltes erfolgte über die Extinktionsmessung bei 260 nm (SAMBROOK et al., 1989).

### 4.2.3 „Differential Display Reverse Transcription“-PCR

Die „Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction“ (DDRT-PCR) identifiziert differentiell exprimierte „mRNA species“ (LIANG und PARDEE, 1992). Durch die Verwendung von 12 verschiedenen „Downstream“-Primern (D-Primer, D1-D12) zur cDNA Synthese, die komplementär zum Poly-A-Ende der RNA sind und zusätzlich zwei weitere Basen besitzen (5'-T<sub>11</sub>VN-3'; V = A, G oder C; N = A, G, C oder T), werden 12 verschiedene cDNA Pools gebildet. Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, werden diese Gruppen mittels PCR amplifiziert, bei der wieder die Primer D1-D12 dem

Pool entsprechend und zusätzlich 26 verschiedene Dekamer-„Upstream“-Primer (U1-U26, BAUER et al., 1993 a, b) zum Einsatz kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der gleiche methodische Ansatz mit einem nicht-radioaktiven Nachweis der DDRT-PCR Fragmente nach LOHMANN et al. (1995) verwendet, der auch mit REN-Display („Rapid and Efficient Method for Nonradioactive Differential Display“) bezeichnet wird.



**Abb. 4.1:** Schema zur Erklärung einer nichtradioaktiven DDRT-PCR (REN-Display; verändert nach ENGELKE, 1999).

Zunächst erfolgte durch Reverse Transkription der Gesamt-RNA die Bildung der 12 oben genannten Pools. Zur Kontrolle ist ein Ansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase durchgeführt worden. In alle Ansätze wurde zur Gesamt-RNA ein D-Primer gegeben, die Proben für 10 min bei 70 °C inkubiert und danach auf Eis gekühlt. Anschließend sind die restlichen Komponenten bis auf die Reverse Transkriptase hinzugefügt, die Ansätze zwei Minuten bei 40 °C inkubiert und zum Schluß die Superscript II (Reverse Transkriptase, Fa. Gibco BRL) hinzugegeben worden. Der 40 µl Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5	µg	Gesamt-RNA
2,5	µM	D-Primer (D1-D12, Fa. Biometra)
50	mM	Tris/HCl pH 8,3
75	mM	KCl
3	mM	MgCl <sub>2</sub>
je 2,5	µM	dATP, dGTP, dCTP, dTTP
10	µM	DTT
80	U	RNAse OUT (Fa. Gibco BRL)
400	U	Superscript II (Fa. Gibco BRL)

Die Reverse Transkription erfolgte für eine Stunde bei 40 °C. Durch eine 5 minütige Inkubation bei 98 °C wurden die Enzyme denaturiert. Zum Schluß wurde der Ansatz durch Zugabe von 20 µl Wasser auf das Endvolumen von 60 µl verdünnt.

Für die „Differential Display“-PCR wurde jeder Pool mit dem entsprechendem D-Primer und 26 U-Primern amplifiziert. Der 20 µl PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

2	µl	cDNA
10	mM	Tris/HCl pH 8,8
50	mM	KCl
1,5	mM	MgCl <sub>2</sub>
2,5	µM	D-Primer (D1-D12, Fa. Biometra)
2,5	µM	U-Primer (U1-U26, Fa. Biometra)
je 150	µM	dATP, dGTP, dCTP, dTTP
0,1	%	Triton X-100
1	U	Dynazyme, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Fa. Biometra)

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma Hybaid-AGS unter folgenden Bedingungen:

45 Zyklen:	10	s	bei 94 °C
		1 min	bei 40 °C
	30	s	bei 72 °C

Zur Kontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit dem Pool gemacht, in dem keine Reverse Transkriptase eingesetzt wurde, um eventuell vorhandene Kontaminationen mit DNA zu detektieren.

#### **4.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung**

Die PCR-Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 5 µl konzentriert und mit 2 µl Ladepuffer versetzt. Die Trennung der Fragmente erfolgte in nativen 10 %igen Polyacrylamidgelen (CleanGel Long 10, Fa. ETC-Elektrophoresetechnik, 20 cm Trennstrecke) in einem Tris-Phosphat/Borat-Puffer pH 7,7 und einer Multiphor II Elektrophorese-Kammer (Fa. Amersham Pharmacia). Der Probenpuffer und die Laufbedingungen wurden nach den Herstellerangaben der Gele (Fa. ETC-Elektrophoresetechnik) für „long distance separation“ gewählt.

Die Silberfärbung der Fragmente erfolgte nach einem abgeänderten Protokoll von BASSAM et al. (1991). Die Gele wurden dazu für 45 min bei 50 °C in 500 ml einer Ethanol-

Essigsäurelösung fixiert, drei mal für jeweils 10 min in Aqua dest. gewaschen, 45 min in 400 ml Silberlösung gefärbt, mit destilliertem Wasser ab gespült und für 6-10 min entwickelt (400 ml Entwickler). Anschließend wurden die Gele für jeweils 20 min in 500 ml Stopplösung und in 500 ml Glycerinlösung imprägniert, bevor sie an der Luft für zwei Tage getrocknet wurden.

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

#### **Ladepuffer**

98	%	Rehydration Buffer (Fertigpuffer, ETC)
0,003	%	Orange G
0,002	%	Bromphenol Blau
0,0016%		Xylencyanol
2	mM	EDTA

#### **Fixierer**

15	%	Ethanol (v/v)
5	%	Essigsäure (v/v)

#### **Silberlösung**

0,1	%	AgNO <sub>3</sub>
0,1	%	Formaldehyd (v/v) p.a.

#### **Entwickler**

2,5	%	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
0,1	%	Formaldehyd (v/v) p.a.
0,002	%	Natrium-Thiosulfat (w/v)

#### **Stopplösung**

2	%	Glycine (w/v)
0,5	%	EDTA (w/v)

#### **Glycerinlösung**

5	%	Glycerin (v/v)
---	---	----------------

## **4.2.5 Reamplifikation und Klonierung polymorpher Fragmente**

Zur Reamplifikation der polymorphen Fragmente wurden diese mit einem Skalpell aus den Gelen geschnitten und in 20 µl Aqua bidest. über Nacht rehydriert. Nach einer fünf minütigen Erhitzung auf 95 °C und Zerkleinerung des Polyacrylamidgelstückes erfolgte ein weiterer 3-4 minütiger Hitzeschritt bei 95 °C und eine Zentrifugation für 5 min bei

13000 x g. Für eine Reamplifikations-PCR wurden 0,1-2 µl des gelösten Fragments eingesetzt und die dem Pool entsprechenden D-Primer. Die übrigen Komponenten dieses 20 µl Ansatzes und das Temperaturprotokoll entsprachen denen der Differential Display-PCR (siehe Kapitel 4.2.3). Anschließend wurden die Fragmente in 1,5 %igen Agarosegelen aufgetrennt.

Die Isolation der Banden aus Agarosegelen, die Ligation und die Transformation wurden wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben durchgeführt.

## **4.2.6 DNA-Isolierung, Restriktion und Southern Blot**

### **DNA-Isolierung**

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von HOISINGTON et al. (1994). Das geerntete Pflanzenmaterial wurde dabei zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und in einer Schwingmühle (Fa. Retsch) gemörsert, alle dabei genutzten Geräte wurden zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt. Jeweils 1,2 g des gemörserten Materials sind zu 6 ml vorgewärmtem CTAB-Extraktionspuffer gegeben worden. Nach 90 minütiger Inkubation bei 65 °C im Schüttelwasserbad wurde ein Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Gemisches hinzugegeben. Es folgte 10 minütiges Schütteln bei Raumtemperatur (RT) und Zentrifugation bei 1000 x g. Die obere der zwei entstandenen Phasen wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und 10 Minuten geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 x g wurde die obere Phase in ein 15 ml „Falcontube“ überführt, mit 10 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml) vermischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol ist die DNA gefällt und mit einem Glashaken in 3-4 ml Waschlösung I überführt worden. Nach zwanzig Minuten wurde die DNA kurz in 1-2 ml Waschlösung II gegeben und dann in 300 µl 1 x TE-Puffer über Nacht bei RT unter Schütteln gelöst.



Zur Kontrolle wurden 20 µl einer 1:40 Verdünnung der DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Konzentration durch Vergleich mit bekannten Mengen an λ-DNA bestimmt.

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

**CTAB-Extraktionspuffer**

67 mM Tris/HCl pH 8,0  
13,4 mM EDTA pH 8,0  
0,93 mM NaCl  
1,34 % CTAB  
0,67 % PVP-40

**Waschlösung I**

76 % Ethanol  
0,2 M NaOAc

**Waschlösung II**

76 % Ethanol  
10 mM NH<sub>4</sub>OAc

**1 x TE**

10 mM Tris/HCl pH 8,0  
1 mM EDTA pH 8,0

**Restriktion**

Für einen Restriktionsansatz wurde die genomische DNA mit 2 U Endonuklease (Fa. Gibco BRL) pro µg DNA in dem entsprechenden Reaktionspuffer für mindestens 5 Stunden bei 37 °C verdaut. Je 15 µg dieser DNA sind über Nacht in einem 0,8 %igen Agarosegel in 1 x TAE-Puffer bei 2 V/cm aufgetrennt worden (SAMBROOK et al., 1989). Als Größenstandard diente der DIG-Molecular-Weight-Marker II (Fa. Roche Diagnostics). Durch Zugabe von 0,1 µg Ethidiumbromid pro ml Gellösung wurde die DNA angefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

**1 x TAE**

40 mM Tris-Acetat  
1 mM EDTA pH 8,0

## **Southern Blot**

Die aufgetrennte, restringierte DNA wurde mittels Southern-Kapillarblot auf ungeladene Nylonmembran (Porablot NY amp-Membran, Fa. Machery-Nagel) transferiert. Zuvor ist das Gel jeweils eine halbe Stunde in Denaturierungspuffer (0,4 N NaOH, 0,6 M NaCl) und in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) geschüttelt worden. Als Transferpuffer für den Kapillarblot diente 25 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,5. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt, die Membranen anschließend kurz luftgetrocknet und die DNA durch zweistündiges Backen bei 80 °C fixiert. Die Filter wurden bei 4 °C aufbewahrt.

## **4.2.7 Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismen**

### **Minipräparation der Plasmide**

Die Bakterienklone wurden über Nacht in 3 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (50 µg/ml Medium) bei 37 °C im Schüttler angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von HOLMES und QUIGLEY (1981). Die Zentrifugationen wurden in einer Sigma 2 K 15 Zentrifuge für Eppendorfgefäße durchgeführt. Nach 5 minütigem Abzentrifugieren der Bakterien bei 10000 upm wurden die pelletierten Bakterien in 160 µl STET-Puffer und 14 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) erneut gelöst und 45 s im Wasserbad aufgeköcht. Nach 15 minütiger Abkühlung auf Eis sind die Zelltrümmer für 15 min bei 4 °C und 15000 upm abzentrifugiert und durch einen Zahnstocher entfernt worden. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 160 µl Isopropanol und Inkubation für 1 h bei -20 °C gefällt, sedimentiert (30 min, 15000 upm, 4 °C) und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 20 µl 1 x TE-Puffer gelöst.

#### **STET-Puffer**

8 %	Saccharose
50mM	Tris/HCl pH 8,0
50mM	EDTA pH 8,0
5 %	Triton X-100

## Digoxigenin-Markierung der Inserts mittels PCR

Die Inserts der Plasmide wurden zunächst durch PCR mit den Primern M13 und M13Revers (M13R) voramplifiziert. Der Ansatz von 50  $\mu$ l setzte sich dabei wie folgt zusammen:

Je 0,2	mM	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
4	mM	MgCl <sub>2</sub>
50	mM	KCl
10	mM	Tris/HCl pH 9,0
0,2	$\mu$ M	M13
0,2	$\mu$ M	M13R
1	U	Taq DNA-Polymerase (Fa. Eurogentec)
0,5-1	ng	Plasmid-DNA

Um Evaporation zu vermeiden, wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer Cetus unter folgenden Bedingungen:

1 min	bei 94 °C
30 Zyklen:	1 min bei 92 °C
	1 min bei 50 °C
	2 min bei 72 °C
5 min	bei 72 °C

Jeweils 10  $\mu$ l des Ansatzes wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und die Konzentration durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen von  $\lambda$ -DNA bestimmt. Für die eigentliche Markierungsreaktion mit Digoxigenin wurden ca. 1 ng des Amplifikationsproduktes als Template eingesetzt. Dabei besaß der PCR-Ansatz ein Volumen von 100  $\mu$ l und enthielt die gleichen Bestandteile wie für die Voramplifikation, mit Ausnahme der Nukleotide, die durch den PCR-DIG-Labeling-Mix (Fa. Roche Diagnostics) ersetzt wurden. Dieser enthält neben je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,19 mM dTTP und 0,01 mM DIG-11-dUTP. Die PCR erfolgte unter den oben genannten

Bedingungen. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Mineralöl durch Zugabe von 50 µl 1 x TE und 40 µl Chloroform zu dem Ansatz, Mischen, kurzer Zentrifugation und Überführen der oberen Phase in ein neues Eppendorfgefäß entfernt. Zur Kontrolle wurden 20 µl des Ansatzes in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Konzentration bestimmt.

### **Southern-Hybridisierung und Detektion**

Die Hybridisierung und Detektion erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von HOISINGTON et al. (1994). Dazu wurden die Filter in Hybridisierungsröhren mit je 25 ml Hybridisierungslösung bei 65 °C für 4 h inkubiert. Die markierte Sonde wurde in 6 ml Hybridisierungslösung gegeben (Endkonzentration ca. 100-200 ng Sonde/ml) und durch 20 minütiges Kochen denaturiert. Mit dieser Lösung erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C.

Anschließend wurden die Filter zweimal 5 min bei RT und für 15 min bei 65 °C in Waschpuffer geschüttelt.

Zum Nachweis der DIG-markierten Sonde nach der Chemilumineszenz-Methode schlossen sich verschiedene Waschschrte an. Die Membranen wurden 2 min in Puffer 1, 30 min in Puffer 2, 30 min in einer 1:15000 Verdünnung des Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragments (Fa. Roche Diagnostics) in Puffer 2, zweimal 15 min in Puffer 2, zweimal 15 min in Puffer 1, 5 min in Puffer 3 und schließlich 20 min lichtgeschützt in einer 1:600 CSPD-Verdünnung (Fa. Roche Diagnostics) in Puffer 3 geschüttelt. Anschließend wurden die Filter in Folie eingeschweißt. Die Exposition von Fuji RX-Röntgenfilmen erfolgte bei RT für ein bis zwei Tage.

Vor einem erneuten Hybridisieren der Filter mußten die alkalilabilen Bindungen zwischen dem Digoxigenin und dem dUTP gespalten werden. Dazu wurden die Membranen kurz in bidestilliertem Wasser inkubiert und für 10 min bei 37 °C in Strip-Lösung gewaschen. Nach kurzem Schütteln in 2 x SSC wurden die Filter in Folie eingeschweißt und bei 4 °C aufbewahrt.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

**Hybridisierungslösung**

5 x SSC  
0,01 % N-Lauroylsarcosin  
0,02 % SDS  
0,3 % Blocking-Reagent  
(Fa. Roche Diagnostics)

**Puffer 1**

0,01 M Tris/HCl pH 7,5  
0,1 M NaCl  
0,05 M MgCl<sub>2</sub>

**Strip-Lösung**

0,2 N NaOH  
0,1 % SDS

**Waschpuffer**

0,3 x SSC  
0,1 % SDS

**Puffer 2**

0,01 M Tris/HCl pH 7,5  
0,15 M NaCl  
0,1 % Blocking-Reagent  
(Fa. Roche Diagnostics)

**20 x SSC**

3 M NaCl  
0,3 M NaCitrat  
pH 7,0

## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 DDRT-PCR

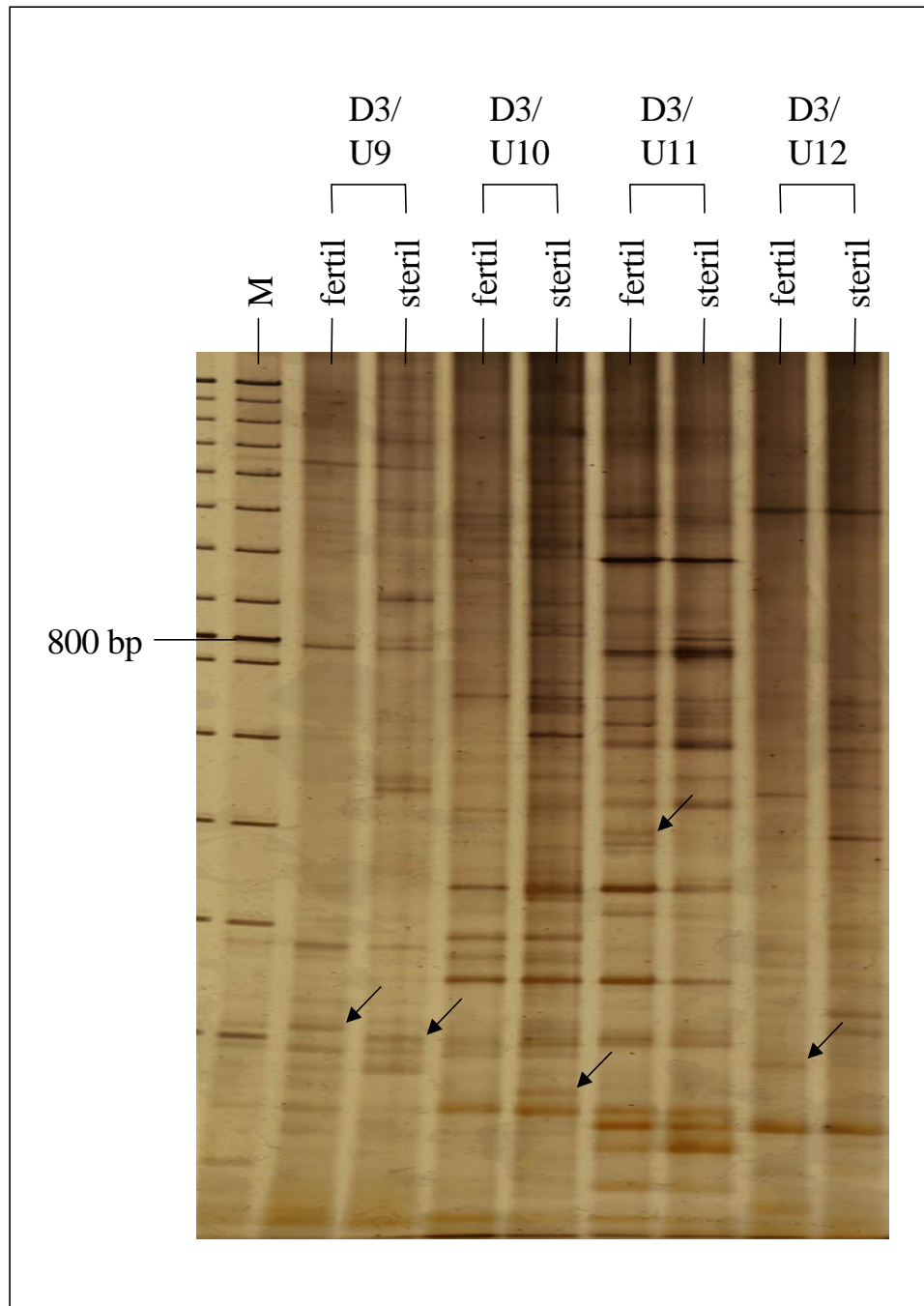
Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, wurde die DDRT-PCR mit gepoolten Einzelpflanzen sogenannten ‚Bulks‘ durchgeführt, da keine isogenen Linien vorhanden waren. Es wurden fünf sterile Pflanzen, die das homozygot rezessive Wilau Gen trugen, bzw. fünf homozygot dominante fertile Pflanzen vereinigt. Das Pflanzenmaterial wird so gewählt, daß beim Transcriptionsmustervergleich möglichst wenig Polymorphismen gefunden werden. Diese Unterschiede sollten mit dem gesuchten Gen korreliert sein. Bei der anschließenden Untersuchung der RNAs des sterilen und des fertilen Bulks mit Hilfe der DDRT-PCR sind sehr viele Polymorphismen gefunden worden. Erwartet wurden zwei Typen von Polymorphismen: 1. Banden, die nur bei den fertilen Pflanzen auftraten und 2. Fragmente, die nur bei den sterilen Pflanzen vorkommen. Im Mittel konnten pro Primerkombination (insgesamt 12 x 26) 2,8 Banden gefunden werden, die nur bei den fertilen Pflanzen und 3,2 Banden, die nur bei den sterilen Pflanzen auftraten. In Tabelle 4.2 ist eine genauere Auswertung der Polymorphismen dargestellt. Die meisten Unterschiede (273 Banden) wurden bei Amplifikationen mit den Primern D3/U1-U26 gefunden. Dabei war die Anzahl der Primerkombinationen, die nicht ausgewertet werden konnten, da eine PCR ausgefallen war oder nach der elektrophoretischen Auswertung keine interpretierbaren Bandenmuster vorlagen, mit einem einzigen Ausfall sehr gering. Die wenigsten Polymorphismen traten bei den Primern D6/U1-U26 auf. Allerdings war die Anzahl der nicht auswertbaren Primerkombinationen mit 19 sehr hoch. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen wurden deshalb die durchschnittliche Anzahl der Polymorphismen pro PCR aus der Gesamtzahl der Unterschiede unter Berücksichtigung der nicht auswertbaren Bandenmuster berechnet. Dabei stellte sich heraus, daß 1,1 Banden/PCR in den Primerkombinationen D4/U1-U26, D6/U1-U26 und D7/U1-U26 erzielt wurden.

**Tab. 4.2:** Auswertung der DDRT-PCR Translationsmuster. Typ 1-Polymorphismen: Banden, die nach DDRT-PCR Amplifikationen nur bei fertilen Pflanzen auftreten, Typ 2-Polymorphismen: Banden, die nach DDRT-PCR Amplifikationen nur bei sterilen Pflanzen auftreten.

Primer-kombination Dx/U1-U26	Typ 1-Poly-morphismus	Typ 2-Poly-morphismus	Anzahl der nicht auswertbaren Primer-kombinationen	Durchschnittliche Anzahl der polymorphen Banden pro PCR *
D1	67	73	7	3,7
D2	44	82	4	2,9
D3	107	166	1	5,5
D4	15	13	13	1,1
D5	40	43	2	1,7
D6	8	7	19	1,1
D7	11	39	4	1,1
D8	31	37	15	3,1
D9	133	129	2	5,4
D10	79	68	0	2,8
D11	92	80	0	3,3
D12	49	54	3	2,2
Summe	676	791	70	3,0

\* Beispiel zur Berechnung der durchschnittlichen Anzahl der polymorphen Banden pro PCR der Primerkombination D1/U1-U26:  $(67+73) : (52-(2 \times 7)) = 3,7$

In Abbildung 4.2 sind Bandenmuster nach Amplifikationen mit den Primerkombinationen D3/U9, D3/U10, D3/U11 und D3/U12 dargestellt, bei denen zusätzlich amplifizierte Banden im sterilen bzw. fertilen Pool vorhanden sind.

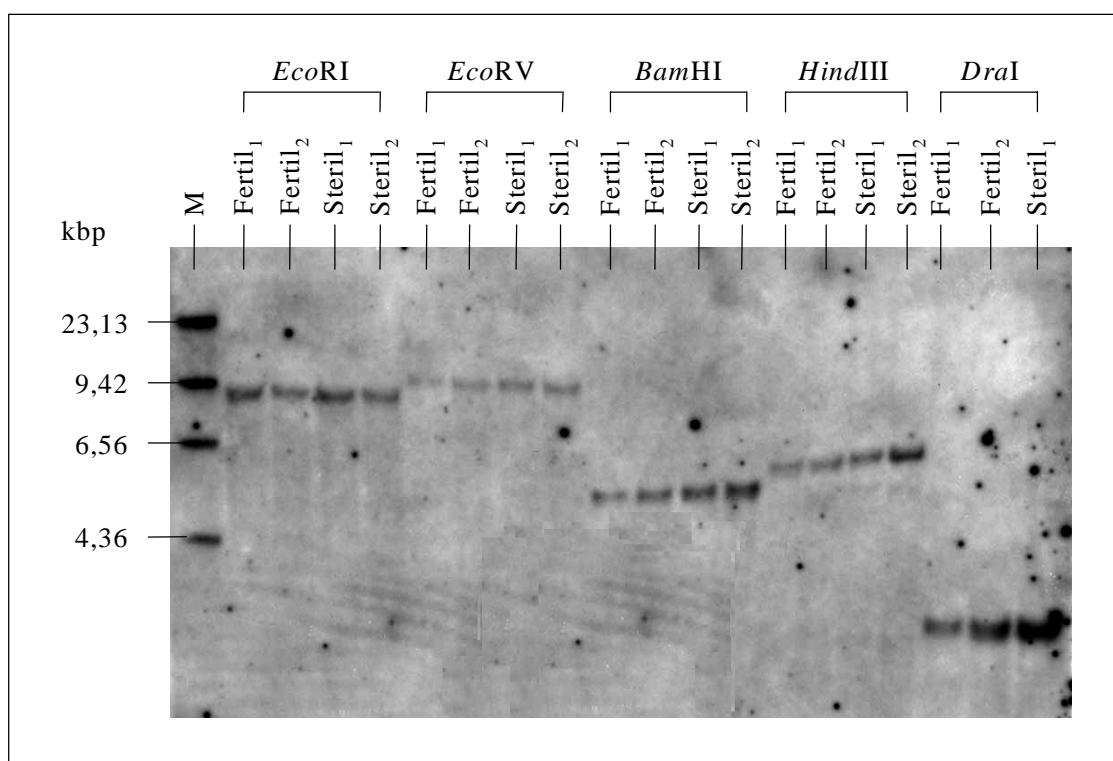


**Abb. 4.2:** Ausschnitt aus einem DDRT-PCR Gel. Die Pfeile zeigen auf Beispiele für Polymorphismen.



### 4.3.2 RFLP-Analysen

Für RFLP-Analysen wurden zufällig 20 Fragmente aus den Polyacrylamidgelen ausgeschnitten, reamplifiziert und kloniert. Durch die RFLP-Analysen soll nachgewiesen werden, ob eine Kopplung zwischen den untersuchten Fragmenten und der Wilau-Sterilität besteht. Der Auswahl der Banden lag ein Kriterium zugrunde: die Größe sollte zwischen 200-1000 bp liegen, wobei große Fragmenten kleineren vorgezogen wurden, da sie spezifischere Hybridisierungen ermöglichen. Es wurden zufällig Banden aus Amplifikationsmustern verschiedener Primerpaare ausgewählt. Mit diesen Sonden wurden nicht-radioaktive Southern-Hybridisierungen durchgeführt. Die untersuchten Enzym/Sonden Kombinationen waren jedoch alle monomorph. In Abbildung 4.3 ist solch ein nicht-radioaktiver RFLP mit monomorphen Bandenmuster dargestellt. Aufgrund der hohen Anzahl der durch die DDRT-PCR detektierten polymorphen Fragmente, und der 20 untersuchten Sonden, die in den RFLP-Analysen keine Unterschiede zeigten, wurden diese Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeiten nicht weiter verfolgt.



**Abb. 4.3:** Bandenmuster nach Hybridisierung restringierter DNA der fertilen und Wilau-sterilen (GMS) Pflanzen mit der Sonde AS-5.12. M: DIG-Molecular-Weight-Marker II (Fa. Roche Diagnostics).

## 4.4 Diskussion

Zur Isolierung des *Wi/wi*-GMS-Gens wurden fünf Pflanzen zu einem Pool zusammengefaßt. Dies beruht auf der „bulk-segregant“-Analyse nach MICHELMORE et al. (1991), bei der DNA mehrerer Individuen des gleichen Phäno- bzw. Genotyps für ein bestimmtes Merkmal zu einer einzigen Probe („Bulk“) vermisch werden. Die Individuen eines Bulks haben an dem für das Merkmal verantwortlichen Genort alle den gleichen Zustand, während die Allele an den anderen Loci zufällig verteilt sind. Dadurch sollten Unterschiede bei dem Vergleich der beiden „Bulks“ nur bei dem merkmals-bestimmenden Genort sowie aufgrund des Kopplungsungleichgewichtes bei eng gekoppelten Markern auftreten. Die „bulk-segregant“-Analyse findet erfolgreich Anwendung bei der Suche nach DNA-Markern (z.B. HUNGER, 1999; BADENES et al., 2000; ZHANG et al., 2000). Deshalb wurde versucht diese Methode auch bei den RNA-Untersuchungen anzuwenden. Es wurden jedoch sehr viele Unterschiede beim Transkriptionsmustervergleich gefunden. Diese Methode scheint sich nicht auf solche Analysen übertragen zu lassen. Die hohe Anzahl von insgesamt 1467 Polymorphismen zeigt, daß durch die Bildung von „Bulks“ nicht nur Unterschiede an *Wi/wi*-Genort gefunden wurden, sondern auch an anderen Loci. Bei anderen Untersuchungen wurde für die DDRT-PCR als Pflanzenmaterial Klonteile einer Pflanze eingesetzt. ENGELKE (1999) setzte diese Methode zur Isolierung des *T*-Gens ein, eines temperatursensitiven Restorergens für die CMS 1 bei *Allium schoenoprasum* L.. Insgesamt wurden dabei 31 Polymorphismen gefunden. Dies zeigt, daß bei Schnittlauch der Einsatz von Klonteilen effektiver ist. Die Untersuchung mittels „Bulks“ könnte zu weniger Polymorphismen führen, wenn mehr Pflanzen vereinigt werden. Bei der Suche nach DNA Markern werden oft „Bulks“ aus einer größeren Anzahl von Pflanzen gebildet. Ein Beispiel sind die Untersuchungen von HUNGER (1999), die für die Suche nach Resistenzgen-Markern mittels „Bulk-Segregant Analysis“ je 10 Pflanzen zu Pools zusammengefasst. Der Nachteil der Vereinigung einer größeren Anzahl von Pflanzen besteht jedoch darin, das „Single-Copy“- Gene trotz PCR nicht erfaßt werden könnten, da sie unterrepräsentiert sind. Dies wird durch die Untersuchungen vom MICHELMORE et al. (1991) bestätigt, die zeigen, daß sogar einige Allele, die im Genom häufiger vertreten sind, bei PCR-Analysen von verschiedenen „bulks“ nur sehr schwach amplifiziert werden. „Single-Copy“-Gene würden nicht nachgewiesen werden.

Bei der Isolierung des M/m Gens für weibliche Blütenbildung bei der Gurke (*Curcumis sativus* L., MIBUS et al., 1998; ENGELKE et al. 1999) mittels DDRT-PCR wurden nur wenige Polymorphismen (39 Unterschiede bei gynözischen Genotypen und 88 bei hermaphroditischen) gefunden. Auch bei dieser Untersuchungen wurden nahe isogene Linien verwendet.

Diese Ergebnisse von ENGELKE (1999), ENGELKE et al. (1999) und MIBUS (1998) zeigen, daß bei verschiedenen Pflanzenarten die Nutzung isogener Linien bei der DDRT-PCR zu weniger Polymorphismen führten, von denen wahrscheinlich ein oder mehrere mit dem untersuchten Genort gekoppelt sind, da die analysierten Pflanzen sich hauptsächlich in diesem unterschieden.

In Tabelle 4.3 ist die Anzahl der Polymorphismen in den Pools D1-D12 dargestellt, die ENGELKE (1999) gefunden hat im Vergleich zu den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit.

Diese Ergebnisse zeigen, daß trotz zwei DDRT-PCR-Analysen am Schnittlauch keine Aussagen über besonders gut geeignete Primerkombinationen gemacht werden können, da bei der Isolierung des *Wi/wi*-Gens beispielsweise die meisten Polymorphismen im Pool D3 und die wenigsten im Pool D6 bzw. unter Berücksichtigung der Ausfälle auch noch in den Pools D4 und D7 (Tabelle 4.2) gefunden wurden. ENGELKE (1999) findet dagegen die meisten Unterschiede in den Pools D6 und D9 und die wenigsten im Pool D7. Dies zeigt, daß bei einer weiteren DDRT-PCR-Analyse erneut alle Primerkombinationen getestet werden müssen, da keine Aussage möglich ist, welche Pools sich am besten zur anfänglichen Untersuchung eignen.

**Tab. 4.3:** Vergleich der Anzahl der gefunden Polymorphismen bei der Isolierung des *T*-Gens und des *Wi/wi*-Gens aus *Allium schoenoprasum* L..

Primerkombination Dx/U1-U26	Polymorphismen bei der Isolierung des T-Gens *	Polymorphismen bei der Isolierung des <i>Wi/wi</i> -Gens
D1	1	140
D2	3	126
D3	1	273
D4	2	28
D5	4	83
D6	6	15
D7	0	50
D8	2	68
D9	6	262
D10	2	147
D11	2	172
D12	1	103
Summe	31	1467

\* verändert nach ENGELKE (1999)

In dieser Arbeit wurden die RFLP-Analysen mit Hilfe des am CIMMYT, Mexiko, für Untersuchungen an Weizen und Mais entwickelten Protokolls für nicht-radioaktive

Hybridisierung und Detektion mit Hilfe der Chemilumineszenz durchgeführt. Dieses Protokoll konnte auch bei Roggen (LOARCE et al., 1996) und Gerste (HUNGER, 1999) eingesetzt werden. Das DIG-System der Firma Roche Diagnostics besitzt eine geringere Sensitivität als radioaktive Nachweismethoden. Dies läßt sich jedoch durch eine effektive Markierung der Sonde mittels PCR anstelle des sonst üblichen „Random primed labeling“ und Exposition über Nacht im Gegensatz zu den vom Hersteller empfohlenen zwei Stunden ausgleichen. Bei dieser Methode wird im Vergleich zum radioaktiven Nachweis kein Isotopenlabor benötigt. Zudem ist die Expositionszeit wesentlich kürzer, die bei radioaktiven Verfahren zum Teil eine Woche oder länger dauert. Die verwendeten markierten Sonden können mehrfach wiederverwendet werden und bis zu einem Jahr gelagert werden. Nachteil dieser Methode ist der höhere DNA-Verbrauch, der durch die häufigere Herstellung von Filtern bedingt ist. Die Verwendung nicht geladener Membranen für den Transfer und die geringere Sensitivität erlaubt eine wiederholte Hybridisierung von ca. fünfmal, wohingegen beim radioaktiven Nachweis die Filter bis zu zehnmal wiederverwendet werden können.

Der Einsatz der 20 reamplifizierten und klonierten Fragmente als Sonde bei den RFLP-Analysen führte nur zu monomorphen Bandenmustern. Bei der Erweiterung der genetischen Kopplungskarte vom Roggen wurden Fragmente aus einer genomischen Bibliothek als Sonde bei RFLP-Untersuchungen eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, daß 35 % der Sonden polymorph waren (SENF, 1996). Andere Untersuchungen mit cDNA-Klonen zeigten einen höheren Polymorphiegrad für cDNA-Klone im Vergleich zu genomischen DNA-Klonen bei Salat (LANDRY et al., 1987) und Tomate (MILLER und TANKSLEY, 1990) einen niedrigeren jedoch beim Menschen (HELENTJARIS und GESTELAND, 1983) und bei der Gerste (GRANER et al., 1991). Da diese Ergebnisse sehr unterschiedlich sind, wurde bei den vorliegenden Analysen zwischen 1 und 7 Polymorphismen erwartet, was 5-35 % entspricht. Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht erzielt werden. Das könnte auch an der kleinen Stichprobe liegen, die 1,4 % der gesamt Polymorphismen repräsentiert. Da RFLP-Analysen sehr zeitaufwendig sind, wurden diese aufgrund des geringen Polymorphiegrades und der großen Anzahl der in der DDRT-PCR gefundenen polymorphen Banden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr fortgeführt.

Um das *Wi/wi*-GMS-Gen aber dennoch zu isolieren, könnten in weiterführenden Arbeiten die gefundenen polymorphen Fragmente zur Kartierung des Schnittlauchgenoms mittels RFLP-Analysen genutzt werden. Dadurch könnten Marker gefunden werden, die das Gen auf beiden Seiten flankieren und eine Klammer bilden. Durch weitere Kartierung kann eine höhere Markerdichte in dem Bereich erzielt werden, die dann als Ausgangspunkt für „Map based cloning“ dienen kann. Eine Alternative zu den RFLP-Untersuchungen wäre die Sequenzierung der polymorphen Fragmente. Anschließend werden Primer konstruiert, so daß durch PCR-Analysen diese Polymorphismen untersucht werden können. Wenn dies zu keinen oder nur wenigen Ergebnissen führt, können Unterschiede auch durch die Restriktion dieser Fragmente gefunden werden. Zudem könnte durch einen Datenbankvergleich der Sequenzen Homologien zu schon bekannten Genen gefunden werden, die einen Hinweis darauf geben könnten, ob die untersuchten Fragmente bei der GMS eine Rolle spielen. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt also in der Schnelligkeit von PCR-Analysen und den durch die Sequenzierung und Homologievergleichen gewonnenen Informationen.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung verschiedener männlicher Sterilitätsformen beim Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.) durch Anwendung molekularbiologischer Methoden und damit eine Erweiterung der Kenntnisse über die molekularen Grundlagen der cytoplasmatischen und der genischen männlichen Sterilität.

Bei der Suche nach einem Marker für das (S)-Sterilitätscytoplasma wurde mit einem Primerpaar ein 900 bp langes Fragment amplifiziert, das sterilitäts-assoziiert ist. Dieses wurde isoliert und sequenziert. Datenbankvergleiche zeigten, daß die Sequenz chimer ist, da zwei Bereiche Homologien zu verschiedenen Abschnitten des *atp9*-Gens zeigen und eine weitere Teilsequenz Ähnlichkeit zum *atp6*-Gen aufweist. Bei der Analyse dieser Sequenz konnten weder konventionelle Start- und Stopkodons gefunden werden, noch solche die nur in Mitochondrien vorkommen. Es wurden spezifische Primerpaare zur Amplifikation von zwei (S)-Cytoplasma-assoziierten Fragmenten abgeleitet, die 420 bp bzw. 490 bp lang sind. Um nachzuweisen, daß diese Fragmente als molekularer Marker für das Sterilitätscytoplasma der CMS 1 dienen können, wurde der Einfluß der Kerngene auf das Vorhandensein dieser Banden untersucht. Es konnte ausgeschlossen werden, daß es sich um einen kernkodierte dominanten Marker handelt. Der Marker ist nur in Pflanzen mit (S)-Cytoplasma vorhanden. Außerdem wurde durch die Untersuchung von einer F<sub>1</sub> und zwei aufeinander folgenden Rückkreuzungsgenerationen gezeigt, daß diese Bande maternal vererbt wird. In der Praxis können diese Primer zur Identifizierung von Pflanzen mit dem (S)-Sterilitätscytoplasma verwendet werden. Auch in restorierten Pflanzen mit (S)-Cytoplasma konnte das sterilitäts-assoziierte Fragment nachgewiesen werden. Damit findet bei der Restoration keine Elimination der sterilitäts-korrelierten Sequenz statt. Eine posttranskriptionale Regulation wird diskutiert.

Durch *in organello*-Translationen wurde die CMS 1 von *Allium schoenoprasum* L. erneut untersucht. Vorherige Untersuchungen hatten widersprüchliche Ergebnisse erzielt: es war ungeklärt, ob das 18 kDa Protein nur sterilitäts-assoziiert in CMS 1 Pflanzen vorkommt oder ob es sowohl in sterilen und fertilen Individuen vorkommt, wobei die Konzentration

im (S)-Sterilitätscytoplasma höher ist als im Normalcytoplasma. Es konnte gezeigt werden, daß das 18 kDa Protein nur in sterilen Pflanzen vorkommt. In weiteren *in organello*-Translationsstudien wurde der Einfluß der *St1/st1*-GMS-Gene auf die mitochondriale Proteinbiosynthese untersucht. Es konnte jedoch kein Unterschied in den Translationsmustern von *St1/st1*-GMS und fertilen Pflanzen gefunden werden, so daß entweder ein Einfluß des *St1/st1*-Gens auf die kernkodierte mitochondrialen Proteine oder ein direkter bzw. indirekter Eingriff in die Mikrosporogenese wurde diskutiert.

Um den Wirkort und Wirkmechanismus eines GMS-Gens erklären zu können, wurde versucht, das *Wi/wi*-GMS-Gen zu isolieren. Dazu wurde die nicht radioaktive „Differential Display Reverse Transcription-PCR“ (DDRT-PCR, REN-Display) eingesetzt, in der in Anlehnung an die „Bulk segregant Analysis“ ein steriler Bulk, der aus Pflanzen gebildet wurde, die das homozygot rezessive *wi*-Gen enthielt, mit einem in Bezug auf das *Wi*-Gen homozygot dominanten fertilen Pool verglichen wurde. Dabei konnten im Mittel pro Primerkombination (26 x 12) 2,8 Banden gefunden werden, die nur bei den fertilen Pflanzen und 3,2 Fragmente, die nur bei den sterilen Pflanzen auftraten. Somit wurden die mRNAs wie erwartet differentiell exprimiert. Für anschließende RFLP-Analysen, die eine Kopplung zwischen den verwendeten Sonden und der Wilau-Sterilität nachweisen sollten, wurden 20 der polymorphen Fragmente zufällig ausgewählt und als Sonde eingesetzt. Für die Untersuchungen wurde die nicht radioaktive-Southern Hybridisierung und Detektion mit Hilfe der Chemilumineszenz für den Schnittlauch etabliert. Bei den RFLP-Analysen wurden jedoch nur monomorphe Bandenmuster gefunden.



# Literaturverzeichnis

- ABAD, A. R.; MEHRTENS, B. J.; MACKENZIE, S. A. 1995: Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile Bean. *Plant Cell* 7: 271-285
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- BADENES, M. L.; HURTADO, M. A.; SANZ, F.; ARCHELOS, D. M.; BURGOS, L.; EGEA, J.; LLACER, G. 2000: Searching for molecular markers linked to male sterility and self-compatibility in apricot. *Plant Breeding* 119: 157-160
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. 1991: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83
- BAUER, D.; MÜLLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHOE, P.; STRAUSS, M. 1993 a: Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique. *Nucleic Acids Res.* 21: 4270-4280
- BAUER, D.; MÜLLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHOE, P.; STRAUSS, M. 1993 b: Differential Display Reverse Transcription PCR. *Bio. Tech.* 2: 32-35
- BECKER, H. 1993: *Pflanzenzüchtung*. Ulmer, Stuttgart
- BENTZEN, P.; COOK, D.; DENTI, D. L.; HARRIS, A.; HOFMAN, J. WRIGHT, J. M. 1990: One tube DNA extraction procedure for molecular fingerprinting. *Fingerprint News* 2: 17-21

- BOUTRY, M.; FABER, A. M.; CHARBONNIER, M.; BRIQUET, M. 1984: Microanalysis of mitochondrial protein synthesis products. *Plant Mol Biol* 3: 445-452
- CHAUDHURY, A. M. 1993: Nuclear genes controlling male fertility. *Plant Cell* 5: 1277-1283
- DE NETTANCOURT, D. 1977: Incompatibility in Angiosperms volume 3 of Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- DE PAEPE, R.; CHÉTRIT, P.; VITART, V.; AMBARD-BRETTEVILLE, F.; PRAT, D.; VEDEL, F. 1990: Several nuclear genes control both male sterility and mitochondrial protein synthesis in *Nicotiana sylvestris* protoclonal lines. *Mol Gen Genet* 222: 206-210
- DEWEY, R. E.; SIEDOW, J. N.; TIMOTHY, D. H. 1986: Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell* 44: 439-449
- DEWEY, R. E.; TIMOTHY, D. H.; LEVINGS III, C. S. 1987: A mitochondrial Protein associated with cytoplasmic male sterility in the T-cytoplasm of maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5374-5378
- DEWEY, R. E.; TIMOTHY, D. H.; LEVINGS III, C. S. 1991: Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize. *Curr. Genet.* 20: 475-482
- ELKONIN, L. A.; TYRNOV, V. S. 2000: Studying genetic control of cytoplasmic male sterility in plants: state of the problem and current approaches. *Russian Journal of Genetics* 36: 347-358
- ENGELKE, T.; TATLIOGLU, T. 1996a: Ansätze zur molekularen Charakterisierung der genisch männlichen Sterilität (GMS) sowie der Reversion der cytoplasmatisch männlichen Sterilität (CMS) bei *Allium schoenoprasum* L.. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 32: 163-165

- 
- ENGELKE, T.; TATLIOGLU, T. 1996b: Molecular characterization of the genic m1e sterility in comparison with the cytoplasmic male sterility in *Allium schoenoprasum* L. Proceedings of the International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, Quedlinburg, Germany, June 30-July 4, 1996. Beiträge zur Züchtungsforschung 2: 206-209
- ENGELKE, T. 1999: Genetischer und molekularer Vergleich verschiedener Formen der männlichen Sterilität als Beitrag zur Etablierung von Hybridzuchtverfahren – *Allium schoenoprasum* L.: Eine Pflanze mit Modellcharakter -. Dissertation am Fachbereich Gartenbau, Universität Hannover.
- ENGELKE, T.; MIBUS, H.; TATLIOGLU, T. 1999: Approaches to isolating the gene *M/m* for femaleness in *Cucumis sativus* L.. Acta Horticulturae 492: 355-362
- ENGELKE, T.; TATLIOGLU, T. 2000a: Mitochondrial genome diversity in connection with male sterility in *Allium schoenoprasum* L.. Theor Appl Genet 100: 942-948
- ENGELKE, T.; TATLIOGLU, T. 2000b: The *wi* gene causes genic male sterility in *Allium schoenoprasum*. Plant Breeding 119: 325-328
- ENGELKE, T.; TATLIOGLU, T. 2000c: Genetic analyses supported by molecular methods provide evidence of a new genic (*st1*) and a new cytoplasmic (*st2*) male sterility in *Allium schoenoprasum* L.. Theor Appl Genet 101: 478-487
- FORDE, B. G.; LEAVER, C. J. 1980: Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondrial polypeptides in male-sterile maize. Proc Natl Acad Sci USA 77:418-422
- FORDE, B. G.; OLIVER, R. J. C.; LEAVER, C. J. 1978: Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasm in maize. Proc Natl Acad Sci USA 75: 3841-3845

- FRANKLIN, F. C. H.; LAWRENCE, M. J.; FRANKLIN-TONG, V. E. 1995: Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *International Review of Cytology* 158: 1-64
- GAGLIARDI, D.; LEAVER, C. J. 1999: Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO J.* 18: 3757-3766
- GRABAU, E. A.; ASLESON, C. M.; HEGENBACH, B. G. 1990: Nucleotide sequence and transcription of the soybean mitochondrial ATPase subunit 9 gene. *Plant Mol Biol* 15: 183-186
- GRANER, A.; JAHOR, A.; SCHONDELMAIER, J.; SIEDLER, H.; PILLEN, K., FISCHBECK, G.; WENZEL, G.; HERRMANN, R. G. 1991: Construction of an RFLP map of barley. *Theor Appl Genet* 83: 250-256
- HANDA, H. 1993: RNA editing of rapeseed mitochondrial *atp9* transcripts: RNA editing changes four amino acids, but termination codon is already encoded by genomic sequence. *Jpn. J. Genet.* 68: 47-54
- HANDA, H.; NAKAJIMA, K. 1992: different organization and altered transcription of the mitochondrial *atp6* gene in male-sterile cytoplasm of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Curr. Genet.* 21: 153-159
- HE, S.; LYZNIK, A.; MACKENZIE S. 1995: Pollen fertility restoration by nuclear gene Fr in cms Bean: nuclear-directed alteration of a mitochondrial population. *Genetics* 139: 955-962
- HELENTJARIS, T.; GESTELAND, R. 1983: Evaluation of random cDNA clones as probes for human restriction fragment polymorphisms. *J. Mol. Appl. Genet.* 2: 237-247

- 
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ DE LEÓN, D. 1994: Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second edition. El Batán, Mexico. DF., CIMMYT
- HOLMES, D. S.; QUIGLEY, M. 1981: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197
- HORN, R.; KÖHLER, R. H.; ZETSCHKE, K. 1991: A mitochondrial 16 kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant Mol Biol* 17: 29-36
- HUNGER, S. 1999: Genetische Analyse und Markierung von Zwergrost- und BaYMV-Resistenzgenen der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation am Fachbereich Biologie, Universität Hannover
- KATO, S.; SHIMAMOTO, Y.; MIKAMI, T. 1995: The apple mitochondrial *atp9* gene: RNA editing and co-transcription with exons a and b of the *nad5* gene. *Physiol. Plantarum* 93: 572-575
- KAUL, M. H. L. 1988: Male sterility in higher plants. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- KAZAMA, S.; SUZUKI, T.; KADOWAKI, K. I.; AKIHAMA, T. 1990: Nucleotide sequence of the F0ATPase subunit 9 gene from tomato mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 18: 5879
- KIANG, A. S.; KAVANAGH, T. A. 1996: Cytoplasmic male sterility (CMS) in *Lolium perenne* L. 2. The mitochondrial genome of a CMS line is rearranged and contains a chimaeric *atp9* gene. *Theor. Appl. Genet.* 87: 681-688
- KRITE, G.; NIEHAUS, K.; PERLICK, A. M.; PÜHLER, A.; BROER, I. 1996: Male sterility in transgenic Tabaco plant induced by tapetum-specific deacetylation of the externally applied non-toxic compound N-acetyl-L-Phosphinotricin. *The Plant Journal* 9: 809-818

- L'HOMME, Y.; BROWN, G. G. 1993: Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile *Brassica* mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus. *Nucleic Acids Res.* 21: 1903-1909
- LAEMMLI, U. K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LANDGREN, M.; ZETTERSTRAND, M.; SUDENBERG; GLIMELIUS, K. 1996: Alloplasmic male-sterile *Brassica* lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDa protein. *Plant Mol. Biol.* 32: 879-890
- LANDRY, B.; KESSELI, R.; LEUNG, H.; MICHELMORE, R. 1987: Comparison of restriction endonucleases and sources of probes for their efficiency in detecting restriction fragment length polymorphisms in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Theor Appl Genet* 74: 646-653
- LEAVER, C. J.; HACK, E.; FORDE, B. G. 1983: Protein Synthesis by isolated plant mitochondria. *Meth. Enzymol.* 97: 467-484
- LEVINGS III, C. S. 1993: Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. *Plant Cell* 5: 1285-1290
- LIANG, P.; PARDEE, A. B. 1992: Differential display of eucariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971
- LIN, X.; KAUL, S.; ROUNSLEY, S.; SHEA, T. P.; BENITO, M.-I.; TOWN, C. D.; FUJII, C. Y.; MASON, T.; BOWMAN, C. L.; BARNSTEAD, M.; FELDBLYUM, T. V.; BUELL, R. C.; KETCHUM, K. A.; LEE, J.; RONNING, C. M.; KOO, H. L.; MOFFAT, K. S.; CRONIN, L. A.; SHEN, M.; PAI, G.; VAN AKEN, S.; UMayAM, L.; TALLON, L. J.; GILL, J. E.; ADAMS, M. D.; CARRERA, A. J.; CREASY, T. H.; GOODMAN, H. M.; SOMERVILLE, C. R.; COPENHAVER, G. P.; PREUSS, D.; NIERMAN, W. C.; WHITE, O.; EISEN, J. A.; SALZBERG, S. L.; FRASER, C. M.; VENTER, J. C. 1999: Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 761-768

- 
- LIND, C.; HALLDEN, C.; MOLLER, I. 1991: Protein synthesis in mitochondria purified from roots, leaves and flowers of sugar beet. *Physiol. Plant.* 83: 7-16
- LOARCE, Y.; GALLEG0, R.; FERRER, E. 1996: A comparative analysis of the genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. *Euphytica* 88: 107-115
- LOHMANN, J.; SCHIKLE, H. P.; BOSCH, T. C. G. 1995: REN Display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Bio. Tech.* 18: 200-202
- MACFARLANE, J. L.; WAHLEITHNER, J. A.; WOLSTENHOLME, D. R. 1990: A broad bean mitochondrial *atp6* gene with an unusually simple, non conserved 5' region. *Curr. Genet.* 18: 87-91
- MANS, R. J.; NOVELLI, D. 1961: Measurement of the incorporation of radioactive amino-acids into protein by a filter-paper disk method. *Arch. Biochem. Biophys.* 94: 48-53
- MARIANI, C.; DE BEUCKELEER, M.; TRUETTNER, J.; LEEMANS, J.; GOLDBERG, R. B. 1990: Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 737-741
- MARIANI, C.; GOSSELE, V.; DE BEUCKELEER, M.; DE BLOCK, M.; GOLDBERG, R. B.; DE GREEF, W.; LEEMANS, J. 1992: A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384-387
- MARIENFELD, J.; UNSELD, M.; BRENNICKE, A. 1999: The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends in Plant Science* 4: 495-502

- MIBUS, H.; ENGELKE, T.; TATLIOGLU, T. 1998: Charakterisierung gynöischer und hermaphroditischer Genotypen mit Hilfe der DDRT-PCR-Technik zur Isolierung des Gens M für weibliche Blütenbildung bei der Gurke (*Cucumis sativus* L.). Vortr. Pflanzenzüchtg. 42: 190-192
- MICHELMORE, R. W., PARAN, I.; KESSELI, R. V. 1991: Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9828-9832
- MILLER, J. C.; TANKSLEY, S. D. 1990: RFLP-analysis of phylogenetic relationships and genetic diversity in the genus *Lycopersicon*. Theor Appl Genet 80: 437-448
- MONÉGER, F.; SMART, C. J.; LEAVER, C. J. 1994: Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. EMBO J 13: 8-17
- MORGENSTERN, B. 1999: DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. Bioinformatics 15: 211-218
- ODA, K.; YAMATO, K.; OHTA, E.; NAKAMURA, Y.; TAKEMURA, M. ET AL. 1992: Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA: A primitive form of plant mitochondrial genome. J. Mol. Biol. 223: 1-7
- ODENBACH, W. 1997: Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung. Parey, Berlin
- POTZ, H. 1992: Interaktionen zwischen Chondriom und Kerngenom im CMS-System bei Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.) und Variabilität des Chondrioms unterschiedlicher Provenienzen. Dissertation am Fachbereich Gartenbau, Universität Hannover



- 
- POTZ, H.; TATLIOGLU, T. 1993: Molecular analysis of cytoplasmic male sterility in chives (*Allium schoenoprasum* L.). Theor. Appl. Genet. 87: 439-445
- RASMUSSEN, J.; HANSON, M. R. 1989: A NADH dehydrogenase submit gene is cotranscribed with the abnormal *Petunia* mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility. MGG 215: 332-336
- RECIPON, H. 1990: The sequence of the sunflower mitochondrial ATPase subunit 9 gene. Nucleic Acids Res. 18: 1644
- RUGE, B.; POTZ, H.; TATLIOGLU, T. 1993: Influence of different cytoplasms and nuclear genes involved in the CMS-system of chives (*Allium schoenoprasum* L.) on microsporogenesis. Plant Breeding 110: 24-28
- SAGHAI-MAROFF, M. A.; SOLIMANN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. 1984: Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc Natl Acad Sci USA 81: 8014-8018
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989: Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Lab Press, Second Edition
- SATHO, Y. 1998: PCR amplification of cms-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). Theor Appl Genet 96: 367-370
- SCHÄGGER, H.; VON JAGO, G. 1987: Tricine sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379
- SCHÄGGER, H.; VON JAGO, G. 1991: Blue native electrophoresis for the isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. Anal. Biochem. 199: 223-231

- SCHNABEL, P. S.; WISE, R. P. 1998: The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science* 3: 175-180
- SCHNEIDER, R.; TATLIOGLU, T. 1994: Tetracyclinsensitivität der cytoplasmatischen männlichen Sterilität (CMS) und mitochondriale Proteinbiosynthese beim Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.). *Votr. Pflanzenzüchtg.* 28: 143-145
- SCHNEIDER, R.; TATLIOGLU, T. 1996a: Das Temperaturregime T des Schnittlauchs (*Allium schoenoprasum* L.) reduziert die Menge des CMS-spezifischen mitochondrialen 18-kDa Proteins nur bei hohen Temperaturen. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 32: 166-168
- SCHNEIDER, R.; TATLIOGLU, T. 1996b: Molecular investigations on tetracycline and temperature sensitivity of cytoplasmic male sterility in *Allium schoenoprasum* L. Proceedings of the International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, Quedlinburg, Germany, June 30-July 4, 1996. *Beiträge zur Züchtungsforschung* 2: 202-205
- SENF, P. 1996: Erweiterung der genetischen Kopplungskarte und Markierung wirtschaftlich wichtiger Gene bei Roggen (*Secale cereale* L.). Dissertation am Fachbereich Biologie, Universität Hannover
- SITTE, P.; ZIEGLER, H.; EHRENDORFER, F.; BRESINSKY, A. 1998: Strasburger Lehrbuch der Botanik. Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- STRYER, L. 1995: Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York
- TANG, H. V.; PRING, D. R.; SHAW, L. C.; SALAZAR, R. A.; MUZA, F. R.; YAN, B.; SCHERTZ, K. F. 1996: Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile *Sorghum*. *Plant Journal* 10: 123-133
- TATLIOGLU, T. 1982: Cytoplasmic male sterility in Chives (*Allium schoenoprasum* L.). *Z. Pflanzenzüchtg.* 89: 251-262

- TATLIOGLU, T. 1985: Influence of temperature on the expression of cytoplasmic male sterility (cms) in chives (*Allium schoenoprasum* L.). Z. Pflanzenzüchtg. 94: 156-161
- TATLIOGLU, T. 1986: Influence of tetracycline on the expression of cytoplasmic male sterility (cms) in chives (*Allium schoenoprasum* L.). Plant Breeding 97: 46-55
- TATLIOGLU, T. 1987: Genetic control of temperature-sensitivity of cytoplasmic male sterility (cms) in chives (*Allium schoenoprasum* L.). Plant Breeding 99: 65-76
- TATLIOGLU, T. 1994: Genetische Analyse neuer Sterilitätsformen beim Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.). Votr. Pflanzenzüchtg. 28: 146-148
- TATLIOGLU, T. 1996: *Allium schoenoprasum* L. – A model plant for investigating the genetic and molecular basis of genic (GMS) and cytoplasmic male sterility (CMS). Proceedings of the International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, Quedlinburg, Germany, June 30-July 4, 1996. Beiträge zur Züchtungsforschung 2: 146-149
- TATLIOGLU, T.; WRICKE, G. 1988: Genetic control of tetracycline sensitivity of cytoplasmic male sterility (cms) in chives (*Allium schoenoprasum* L.). Plant Breeding 100: 34-40
- THE EUROPEAN UNION ARABIDOPSIS GENOME SEQUENCING CONSORTIUM & THE COLD SPRING HARBOR, WASHINGTON UNIVERSITY IN ST LOUIS AND PE BIOSYSTEMS ARABIDOPSIS SEQUENCIN CONSORTIUM 1999: Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 402: 769-777
- UNSELD, M.; MARIENFELD, J. R., BRANDT, P.; BRENNICKE, A. 1997: The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. Nat Genet 15: 57-61
- UPHOFF, H. 1994: Erstellung einer genetischen Karte bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) mit Hilfe von RAPD-Markern. Dissertation, Universität Hannover

- WARD, G. C. 1995: The Texas male sterile cytoplasm of maize. *The Molecular Biology of Plant Mitochondria* (Levings III, C. S. and Vasil, I. K. eds), 433-459
- WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. 1993: *Rekombinierte DNA*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford
- WISE, R. P.; FLISS, A. E.; PRING, D. R.; GENGENBACH, B. G. 1987: Urf13-T of T cytoplasm maize mitochondria encodes a 13 kDa polypeptide. *Plant Mol Biol* 9: 121-126
- XUE, Y.; COLLINS, S.; DAVIES, D. R.; THOMAS, C. M. 1994: Differential screening of mitochondrial cDNA libraries from male-fertile and cytoplasmic male sterile sugar beet reveals genome rearrangements at *atp6* and *atpA* loci. *Plant Mol Biol* 25:91-103
- XUE, Y.; THOMAS, C. M.; DAVIES, D. R. 1989: Nucleotide sequence and transcription of the sugar beet mitochondrial FOF1-ATPase subunit 9 gene. *Nucleic Acids Res.* 17: 8857
- YOUNG, E. G.; HANSON, M. R. 1987: A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 50: 41-49
- ZHANG, B. X.; HUANG, S. W.; YANG, G. M.; GUO, J. Z. 2000: RAPD markers linked to a major fertility restorer gene in pepper. *Euphytica* 113: 155-161

# Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Tatlioglu für die Überlassung des Themas, die Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft. Bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Jacobsen möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich herzlich bei Frau I. Robotta bedanken, die durch ihre vielseitige Unterstützung und ihre zuverlässige Mitarbeit mir eine große Hilfe war. Der studentischen Hilfskraft M. Klein danke ich für ihre Mitarbeit bei den Versuchen und bei der Literaturrecherche.

Allen meinen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus der Abteilung Angewandte Genetik danke ich für die vielseitige Unterstützung, die Hilfsbereitschaft bei praktischen Fragestellungen und die Diskussionsbereitschaft. Frau Dr. Esch, Frau Dr. Hunger und Frau Dr. S. Möhring danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts, für die Hilfe bei Computerproblemen und die vielen guten Ratschläge, die mir sehr weitergeholfen haben. Außerdem möchte ich ihnen und Frau Dr. M. Niemann für die gemeinsamen Unternehmungen danken, die sehr zur netten Arbeits- und Lebensatmosphäre beigetragen haben.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung auf Ihre sehr eigene Weise, insbesondere meinem Bruder, der mir bei der Einrichtung des Computers geholfen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund, Herrn Dr. D. Hoffmann, der mir stets eine große Hilfe war und mich in seiner persönlichen Weise unterstützt hat und damit zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und ihre Ermutigungen. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.



# Lebenslauf

Name: Gieta Dewal  
Geboren: 03. November 1967 in Duisburg  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

1973 - 1977 Wichernschule, Dorsten  
1978 – 1987 St. Ursula Gymnasium, Dorsten

## Hochschulbildung:

10/1987 – 03/1994 Studium der Biologie an der Universität Osnabrück  
07/1995 – 10/2000 Promotionsstudium an der Abteilung Angewandte Genetik der  
Universität Hannover

## Berufstätigkeit

07/1994 – 06/1995 Wissenschaftliche Hilfskraft bei der Firma Ruhrgas AG, Dorsten  
07/1995 – 09/1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Abteilung Angewandte  
Genetik der Universität Hannover  
Seit 11/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für  
Züchtungsforschung, Köln