

**Mitochondriale Genom- und Expressionsanalysen
zur Charakterisierung der CMS-Systeme
Tournefortii, *Juncea* und *Tokumasu*
des Raps (*Brassica napus* L.)**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Jens-Holger Dieterich

Geboren am 01.07.1967 in Rotenburg (Wümme)

2002

Referent: Prof. Dr. U. K. Schmitz, FB Gartenbau, Universität Hannover

Koreferent: PD Dr. S. Binder, FB Biologie, Universität Ulm

Tag der Promotion: 18.12.2002

Schlagworte dt. CMS, atp9, *Brassica*

Schlagworte eng. CMS, atp9, *Brassica*

Zusammenfassung

Cytoplasmatische Männliche Sterilität (CMS) äußert sich darin, dass die männlichen Blütenorgane, die Antheren, keinen befruchtungsfähigen Pollen bilden können oder völlig reduziert sind. Es tritt eine Störung im Stadium der Sporo- oder Gametogenese auf, ohne dass die weiblichen Blütenorgane oder der Rest der Pflanze beeinträchtigt werden. Die Ursachen für CMS in Pflanzen sind vielfältig. In der Regel beruhen sie auf einer mitochondrialen Dysfunktion, die auf ein nicht richtig funktionierendes Zusammenspiel von Kern und Mitochondrien zurückgeführt wird.

In der vorliegenden Arbeit ist es anhand umfangreicher Vergleiche der mitochondrialen Genome und der mitochondrialen Transkriptionsprofile gelungen, die CMS *Tournefortii* „Stiewe“ sowohl von der CMS *Tournefortii* „Landgren“ als auch von der CMS *Juncea* und *Tokumasu* abzugrenzen. Dazu wurde erstmals in *Brassicaceae* ein systematisches Transkriptionsprofil für 25 mitochondriale Gene der Atmungskette und der Energiegewinnung erstellt. Es konnte gezeigt werden, dass der Genbereich atp6-Orf 263 zwar in allen untersuchten Linien existiert, jedoch nur in der CMS *Juncea* exprimiert wird. Damit scheidet er als Ursache für die männliche Sterilität der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ aus.

Desweiteren wurden Unterschiede in der Transkription zwischen den fertilen Rapslinien „Duplo“ und „Andor“ gefunden, die sich auf die unterschiedlichen Kernhintergründe der Sorten zurückführen lassen. Der Anteil liegt bei 24% der untersuchten Gene.

Bei der Transkriptionsanalyse der CMS Systeme *Tournefortii* „Stiewe“ und CMS *Juncea* wurden vier Kandidatengene (atp9, nad2, nad9, cob) als mögliche Ursache der männlichen Sterilität identifiziert. Zwei davon (atp9 und cob) wurden näher untersucht. Für das cob-Gen wird eine Modifikation in der Transkription angenommen, die entweder im Bereich rps14-cob oder im 3'-Bereich von cob liegt.

Die Untersuchungen des atp9-Genbereichs ergaben in beiden CMS-Linien mindestens zwei Genkonfigurationen, von denen eine (atp9-2a) bisher nicht beschrieben ist. Diese besitzt im 5'-Bereich ein mit atp9 kotranskribiertes offenes Leseraster von 193 Aminosäuren, das eine Ähnlichkeit zum Genprodukt von atp6 aufweist. In der fertil restaurierten Linie scheint dieses Transkript vermindert. Das atp9-2a Kotranskript könnte als Ursache für die CMS in Frage kommen. Weiterführende Experimente zur Charakterisierung, sowie zur Translation und Lokalisation des Proteins in den Mitochondrien müssen noch unternommen werden.

Summary

The aim of this work was to broaden the knowledge on cytoplasmic male sterility (CMS) in rapeseed. Three CMS types of different origin were investigated: i) CMS *Tournefortii* "Stiewe" (generated by asymmetric protoplast fusion of *Brassica napus* and *Brassica tournefortii*), ii) CMS *Tournefortii* "Landgren" resp. CMS *Juncea* (generated by crossing of male sterile *Brassica juncea* into *B. napus*) and iii) CMS *Tokumasu* (generated by transfer of a *Raphanus sativus* cytoplasm into *B. napus*).

The orf 263, which presumably is associated with CMS *Tournefortii* "Landgren", was investigated in the three CMS types. Mitochondrial transcript profiles were created to determine expression differences of fertile and male sterile lines. Differences in mitochondrial genome composition of *A. thaliana*, *B. tournefortii*, *B. napus*, *B. oleracea* and the three CMS types were investigated by RFLP analysis using 25 mitochondrial probes and five different restriction enzymes.

RFLP data of *A. thaliana* show a similarity of 8-14% compared to the other *Brassicaceae*. Therefore, comparison of the genomes is inapplicable. CMS *Tournefortii* "Stiewe" and CMS *Juncea* show a high degree of similarity (74-81%) with the plasma donor *B. tournefortii*. The similarity with the nucleus donor *Brassica napus* is 51-58%. RFLPs unique to CMS *Tournefortii* "Stiewe" due to recombination or changes in substoichiometry add up to 11%. CMS *Tokumasu* is the most derived CMS type in this comparison. The identity to the other CMS types only is 46-53%. The orf 263 is present in the mitochondrial genome of all plants investigated. However, expression was detected only in CMS *Juncea*. Hence, orf 263 is not the reason for male sterility in CMS *Tournefortii* "Stiewe" and CMS *Tokumasu*. In the transcription analysis, 24% of the differences found between the rapeseed lines are due to the different nucleic background of "Andor" and "Duplo" and not to differences between fertile and sterile lines. Four candidate genes were detected which could be responsible for male sterility (*atp9*, *nad2*, *nad9*, *cob*). *Atp9* and *cob* were investigated more closely. For *cob*, a transcription modification in the *rps14-cob* region or 3' of the gene is presumed. For *atp9* at least two genes were found. One gene was so far unknown (*atp9-2a*). The 5' region of *atp9-2a* contains an open reading frame of 193 amino acids which is co-transcribed with *atp9*. The deduced protein shows similarity to *atp6* and could be responsible for male sterility in CMS *Tournefortii* "Stiewe" and CMS *Juncea*.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines zum Raps	1
1.2 Definition der Heterosis und ihre Bedeutung in der Pflanzenzucht	2
1.3 Cytoplasmatische Männliche Sterilität in der Pflanzenzucht	4
1.4 Vererbung der CMS	5
1.5 Voraussetzungen für die CMS-Züchtung	5
1.6 Überblick über mitochondriale Genome	6
1.7 Eigenschaften pflanzlicher mitochondrialer Genome	7
1.8 Molekulare Mechanismen der CMS-Systeme	9
1.9 Beschreibung ausgewählter CMS-Systeme	10
1.9.1 Die CMS <i>Texas</i> im Mais	10
1.9.2 Die CMS <i>Ogura</i> des Raps	12
1.9.3 Die CMS der Petunie	14
1.10 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Pflanzenmaterial	17
2.2.1 Herstellung männlich steriler, fertiler und restaurierter Linien	18
2.2.2 Anzuchtbedingungen und Vermehrung des Pflanzenmaterials	18
2.3 Aufreinigung von Mitochondrien aus verschiedenen <i>Brassicaceae</i>	18
2.4 Isolierung von DNA und RNA aus Rapsmitochondrien	18
2.5 Reinigung von PCR-Produkten aus EtBR-Agarosegelen	19
2.6 PCR zum Nachweis des Orf 263	20
2.7 Southernblotanalyse	20
2.8 Northernblotanalyse	22
2.9 Herstellung mtGensonden für Southern- und Northernblot	22
2.9.1 Primer- und Sondendesign	22
2.9.2 Markierung der Sonden	24
2.10 Sondenüberspannende PCR	25
2.11 RAPD-PCR mit mitochondrialer DNA	25
2.12 ALB-Splinkerette-PCR	26
3. Ergebnisse	29
3.1 Analyse der atp6-Orf 263-Region einer möglichen CMS auslösenden Region der... mtDNA	29
3.2 Suche nach CMS-spezifischen-Polymorphismen mittels RAPD-PCR	33
3.3 Suche nach CMS spezifischen-Polymorphismen mittels Southernanalyse	35
3.4 mtGenomcharakterisierung mittels sondenüberspannender PCR	45
3.5 Untersuchung der mitochondrialen Transkription in fertilen und männlich sterilen ... Linien mittels Northernblotanalyse	47
3.6 Charakterisierung des mtGenombereich von atp9 mittels ALB-Splinkerette-PCR	49
4. Diskussion	56
4.1 Vergleich der CMS-Systeme <i>Tournefortii</i> „Landgren“ und „Stiewe“	56
4.2 Suche nach CMS-spezifischen Polymorphismen mittels RAPD-PCR	57
4.3 Charakterisierung der einzelnen mtGenome mittels RFLP-Analyse	60
4.4 Charakterisierung der einzelnen <i>Brassica</i> -Linien mittels Transkriptanalyse	61
4.5 ALB-Splinkerette-PCR	65
4.6 Analyse des atp9-Genorts der CMS <i>Tournefortii</i> „Stiewe“	65
5. Zusammenfassung	70

6. Literaturverzeichnis	72
7. Anhang	81
7.1 Primersequenzen	81
7.1.1 RAPD-Primer	81
7.1.2 Splinkerette-Primer	81
7.2 Sonden- und Gensequenzen	81
1. Sonde atp1	81
2. Sonde atp6	82
3. Sonde atp9	82
4. Sonde cox1	82
5. Sonde cox2	82
6. Sonde cox3	83
7. Sonde nad1	83
8. Sonde nad2	83
9. Sonde nad3	84
10. Sonde nad4	84
11. Sonde nad4L	84
12. Sonde nad5	84
13. Sonde nad6	85
14. Sonde nad7	85
15. Sonde nad9	85
16. Sonde ccb203	86
17. Sonde BNccb206	86
18. Sonde ccb256	86
19. Sonde ccb382	86
20. Sonde ccb452	87
21. Sonde BNcob	87
22. Sonde matR	87
23. Sonde orfB/nad2	88
24. Sonde orfX	88
25. Sonde atp6-ncrA	88
26. Sonde ncrA	89
27. Sonde ncrB	89
28. Sonde atp6-orf263	89
29. Sonde orf263 ²	90
30. atp9-Genbereich „D34atp9-2“ der CMS <i>Tournefortii</i> „Stiewe“	90
31. Sonde 5'atp9-2	91
32. atp9-Genbereich „D34atp9-2a“ der CMS <i>Tournefortii</i> „Stiewe“	91
33. Sonde 5'atp9-2a	92
34. Translation des 5'-Bereichs von atp9-2a der CMS <i>Tournefortii</i> "Stiewe"	92
35. Vektorsequenz pGemT	92
7.3 Genbankeinträge	93
7.4 Ergebnisse der Southernblothybridisierungen	94
7.5 Ergebnisse der Northernhybridisierungen	98
7.6 Abkürzungsverzeichnis	100
Lebenslauf.....	102
Veröffentlichungen	103

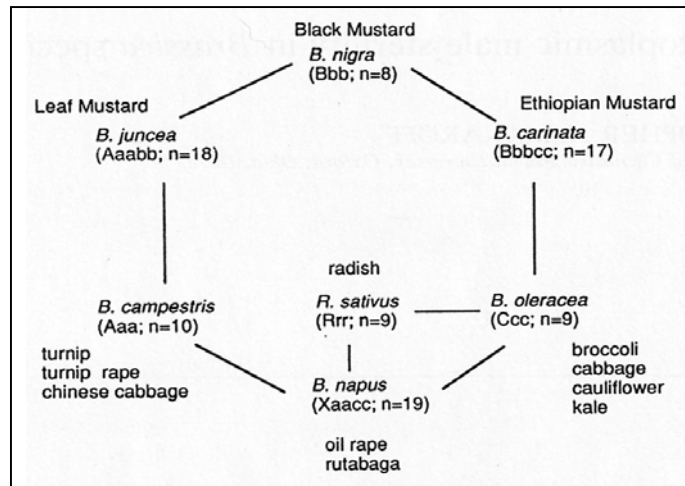


Abb. 1.1.2: Phylogenie der diploiden und tetraploiden Kulturarten von *Brassica* und *Raphanus sativa* nach Makaroff (1995)

Raps kommt in zwei Formen vor, dem einjährigen Sommerraps und dem zweijährigen Winterraps. In Deutschland wird zu 98% Winterraps angebaut. Er ist Deutschlands wichtigste Ölsaat. Von 1996 bis 2001 stieg seine Anbaufläche um etwa 33% von rund 850.000 ha auf ca. 1,1 Millionen ha. Das sind 95% der gesamten Ölsaatenanbaufläche in Deutschland (2001). Der Anteil von 00-Raps (d.h. erucasäurefrei und glucosinolatarm) an der Anbaufläche zur technischen Verwertung (Biodiesel, Schmierstoffe, Oleochemie) beträgt ca. 27%, der Rest ist Futterraps oder wird in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie verwendet. In der gesamten EU liegt der Anteil von Raps und Rübsen an der Ölsaatenanbaufläche bei ca. 43%, gefolgt von der Sonnenblume mit ca. 36%. Damit nimmt der Raps in der EU die grösste Anbaufläche für Ölsaaten ein. Deutschland ist sowohl flächen- als auch ertragsmässig der grösste Rapsproduzent innerhalb der Europäischen Union. Der deutsche Anteil an der gesamten Raps- und Rübsenanbaufläche der EU liegt bei ca. 38%. (www.ufop.de).

1.2 Definition der Heterosis und ihre Bedeutung in der Pflanzenzucht

Der Begriff der Heterosis kann definiert werden als:

„[...] the interpretation of increased vigor, size, fruitfulness, speed of development, resistance to disease and insect pests, or to climatic rigors of any kind, manifested by crossbred organisms as compared with corresponding inbreds, as the specific results of unlikeness in the constitutions of the uniting parental gametes“ (Shull 1952).

Die Bedeutung der Heterosis sei am Beispiel der Kornertragsmenge des Mais von 1866 bis 2000 in den USA erklärt (www.usda.gov/nass/pubs/histdata.htm).

Bis ca. 1930 wurden überwiegend offen bestäubte Sorten angebaut, d.h. der Wind verteilte den Pollen beliebig über die Pflanzen, die Selbstbestäubung war möglich, die Heterosis konnte nicht genutzt werden. Der Ertrag lag bei etwa 1,5 Tonnen pro Hektar und Jahr.

Von 1930 bis etwa 1960 wurden überwiegend Doppelkreuzungshybriden verwendet (Abb. 1.2.1). Der Ertrag stieg auf 3,5 Tonnen pro Hektar und Jahr.

Ab 1960 wurden überwiegend Einzelkreuzungshybriden (Abb. 1.2.1) genutzt. 1996 lag der Ertrag bei ca. 8 Tonnen pro Hektar und Jahr (Lamkey *et al.* 2002).

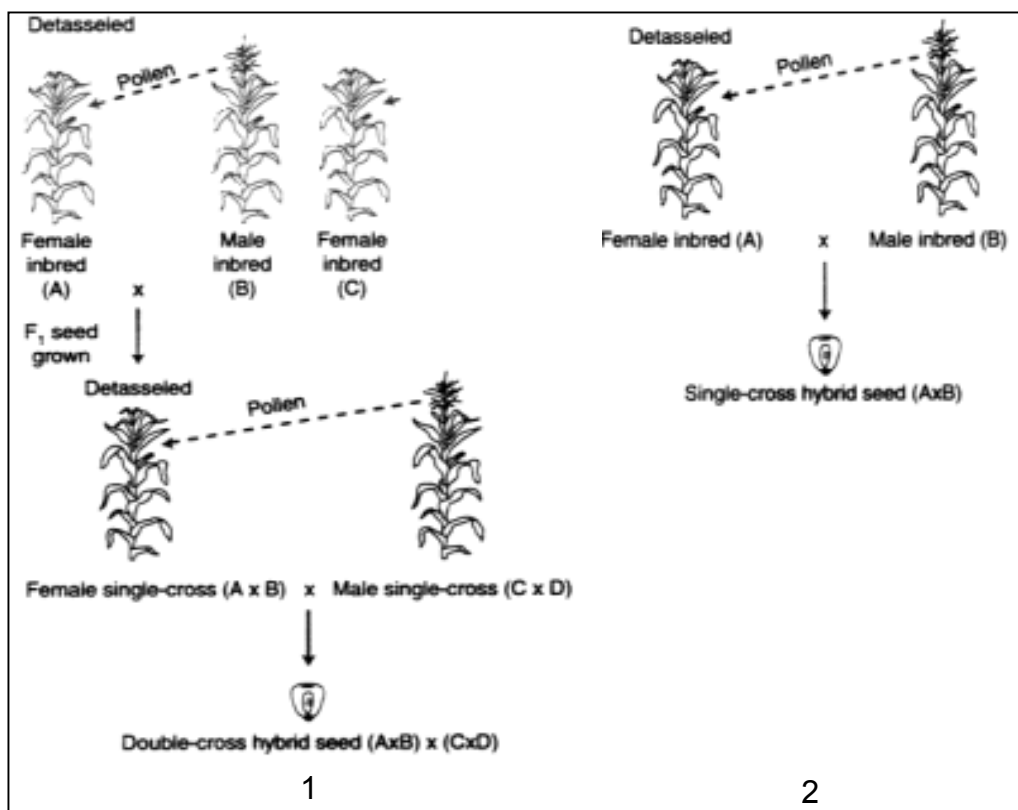


Abb. 1.2.1: Kreuzungsschema zur Erzeugung von (1) Doppel- und (2) Einzelkreuzungshybriden des Mais nach CIMMYT (2002)

Im Mais lässt sich die Selbstbefruchtung maschinell gut verhindern. Man schneidet bei der weiblichen Inzuchtlinie die sogenannte Fahne, die die Antheren trägt und an der Spitze der Maispflanze sitzt, maschinell ab und verhindert so die Selbstbefruchtung. Das ist beim Raps nicht möglich, da die Antheren zusammen mit dem Fruchtknoten in der Blüte sitzen, so dass gezielte Kreuzungen allein durch aufwändiges Kastrieren der Blüten von Hand möglich ist. Dies ist allenfalls im kleinen Rahmen, nicht aber im Feldmasstab zu verwirklichen. Dennoch möchte man den Heterosiseffekt auch im Raps nutzen, denn Kreuzungsstudien zur Erzeugung von F₁-Hybriden

in Sommerraps ergaben ein hohes Heterosispotential*. Verglichen mit Inzuchtlinien wurden Ertragssteigerungen von bis zu 60% (Sernick *et al.* 1983), und bezogen auf die besten vorhandenen Linien von mindestens 12% (Léon 1991) bis maximal 30% (Renard *et al.* 1992), erzielt.

1.3 Cytoplasmatische Männliche Sterilität in der Pflanzenzucht

Da der Raps sowohl ein Fremd- als auch ein Selbstbestäuber ist, die Selbstbestäubungsrate kann bis zu 50% betragen (Rudloff *et al.* 1984), lässt sich der Heterosiseffekt nicht nutzen, denn zur Erzeugung der Hybridnachkommen muss eine Selbstung der Eltern vermieden werden. Dies ist der Grund, weshalb Züchtungs- und Ertragssteigerungen im Raps lange nur durch die für Selbstbefruchter entwickelte Stammbaumethode zu erzielen waren (Röbbelen 1985).

Um das Heterosispotential des Raps auszuschöpfen, bedient man sich eines natürlichen Phänomens, der Cytoplasmatischen Männlichen Sterilität (CMS). Sie tritt in weit über 150 Pflanzenarten spontan auf (Laser *et al.* 1972, Mackenzie *et al.* 1994). Ferner lässt sie sich gezielt erzeugen, indem man entfernt miteinander verwandte Arten kreuzt, was zu einer Kern-Plasmastörung führen kann, die zu CMS führt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Protoplastenfusion zweier Arten, in der die eine Art den Kernhintergrund liefert und die andere das Cytoplasma mit den Organellen (asymmetrische Protoplastenfusion).

Die CMS äussert sich darin, dass die männlichen Blütenorgane, die Antheren, keinen befruchtungsfähigen Pollen bilden können oder völlig reduziert sind (Abb. 1.3.1).

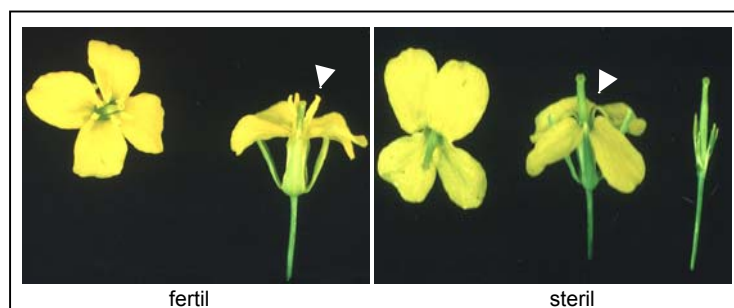


Abb. 1.3.1: Vergleich von fertilem und männlich sterilem Raps bei der CMS *Tokumasu*. Die Antheren (Pfeil) sind deutlich verkümmert bzw. nicht vorhanden.

* Es ist zu beachten, dass der Begriff der Hybride nicht mit dem der Heterosis gleichgesetzt wird. Heterosis kann zwar nicht ohne Hybriden erzeugt werden, aber nicht alle Hybriden zeigen Heterosis.

Es tritt eine Störung im Stadium der Sporogenese oder der Gametogenese auf, ohne dass die weiblichen Blütenorgane oder der Rest der Pflanze beeinträchtigt werden. Während der Bildung der Blüten und dort besonders in den Antheren, kommt es zu einer Heraufregulierung mitochondrialer Transkripte der Elektronentransportkette (Warmke *et al.* 1978, Brennicke *et al.* 1999) und der ATP-Synthasegene (Smart *et al.* 1994). Dies deutet auf einen verstärkten Energiebedarf der Zellen hin. Da dieser von den Mitochondrien der CMS-Pflanzen nicht bereitgestellt werden kann, kommt es zum Absterben des betreffenden Gewebes.

Die Ursachen für CMS in Pflanzen sind vielfältig. In der Regel beruhen sie auf einer mitochondrialen Dysfunktion, die auf ein nicht richtig funktionierendes Zusammenspiel von Kern und Mitochondrien zurückgeführt wird.

1.4 Vererbung der CMS

Die Vererbung von Mitochondrien erfolgt bei höheren Pflanzen überwiegend maternal. Bei über 200 untersuchten Angiospermen weisen lediglich 20% plastidäre und/oder mitochondriale DNA im Pollen auf und lassen eine biparentale Vererbung vermuten (Corriveau *et al.* 1988).

In *Arabidopsis thaliana* erfolgt sie rein maternal (Martinez-Zapater *et al.* 1992, Nagata *et al.* 1999). Dies gilt auch für *Brassica*. Allerdings fanden Erickson *et al.* (1990, 1993) bei Experimenten mit Raps die Übertragbarkeit eines mitochondrialen Plasmids durch Pollen heraus, die vom Genotyp der gewählten Mutter- und Vaterlinie abhängig war. Es scheint sich hierbei aber um eine Ausnahme zu handeln. Beim Raps wird die CMS also über die Mitochondrien rein mütterlich vererbt und folgt nicht den mendelschen Regeln.

1.5 Voraussetzungen für die CMS-Züchtung

Zur Hybridzüchtung beim Raps müssen für ein vollständiges CMS-System folgende Komponenten vorhanden sein:

- a) Die CMS-Linie, die als Mutterlinie dient,
- b) eine Vaterlinie, die zum Erhalt der Mutterlinie dient und die CMS nicht aufheben kann (Maintainer) und
- c) eine Restorerlinie, die in ihrem Kerngenom Gene besitzt, die die männliche Sterilität aufheben (restaurieren), so dass die Nachkommen aus Restorer und CMS-Linie wieder Samen ansetzen können.

Durch Kreuzung und Protoplastenfusion sind mittlerweile verschiedene CMS-Systeme erhalten worden. Oftmals sind diese aber züchterisch nicht verwertbar, da sie entweder nicht restauriert werden können, nicht umweltstabil sind, oder die Pflanzen insgesamt in ihrer Entwicklung geschädigt sind (Details siehe Stiewe *et al.* 1995). Lediglich die CMS-Systeme *Polima* und *Ogura* werden im Raps kommerziell genutzt. Ersteres ist unter europäischen Klimabedingungen (Hitze) aber nicht stabil und letzteres ist aufgrund der hohen Lizenzgebühren in der Nutzung sehr teuer.

1.6 Überblick über mitochondriale Genome

Die genauen molekularen Ursachen, die zur CMS führen, sind nur teilweise erforscht. Um sie zu verstehen, muss man die genetische Struktur der Mitochondrien kennen.

Zwar wurde die CMS in Mais schon in den 1940er Jahren beschrieben (Rhoades 1943), aber erst 1963 wurde entdeckt, dass Mitochondrien eigene DNA besitzen (Nass *et al.* 1963). 1976 wurde von Levings *et al.* festgestellt, dass die CMS *Texas* im Mais mit einer Änderung des mitochondrialen RFLP-Musters zusammenhängt und 1986 wurde das mitochondriale Gen, das für die CMS *Texas* im Mais verantwortlich ist, sequenziert (Dewey *et al.* 1986).

1990 wurde das erste komplette mitochondriale Genom einer einzelligen Grünalge, *Scenedesmus obliquus*, veröffentlicht (Kück *et al.* 1990). Es ist mit 42,7 kB viereinhalb mal kleiner als das erste 1992 veröffentlichte mitochondriale Genom eines Embryophyten, dem Brunnenlebermoos *Marchantia polymorpha*, (Oda *et al.* 1992), das ca. 187 kB gross ist.

1996 wurde dann das mitochondriale Genom der ersten Gefässpflanze, der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana*, komplett publiziert (Unseld *et al.* 1997). Mit ca. 367 kB ist es fast doppelt so gross wie das von *Marchantia polymorpha*.

2000 folgte das erste mitochondriale Genom einer Nutzpflanze, der Rübe *Beta vulgaris* (Kubo *et al.* 2000). Es hat etwa die gleiche Grösse wie das von *A. thaliana*.

Im Vergleich zu den Säugetieren, bei denen bisher (09/2002) die Mitochondrien von 72 Arten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes>) vollständig sequenziert sind, kennt man also bei den höheren Pflanzen nur zwei komplette mtGenome. Dies erklärt sich zum Teil aus dem Grössenunterschied der mitochondrialen Genome zwischen Tieren und Pflanzen. Die Genomgrösse der Mitochondrien in Metazoen beträgt nur etwa ein Zwanzigstel der Grösse in *Arabidopsis thaliana*. Es gibt noch bedeutend grössere mitochondriale Pflanzengenome, die eine Grösse bis zu zweieinhalb Megabasen haben (Ward *et al.* 1981). Der Grössenunterschied beruht dabei nicht auf einer höheren Anzahl kodierender Gene, sondern überwiegend auf der Grösse der nichtkodierenden Regionen (Abb. 1.6.1)

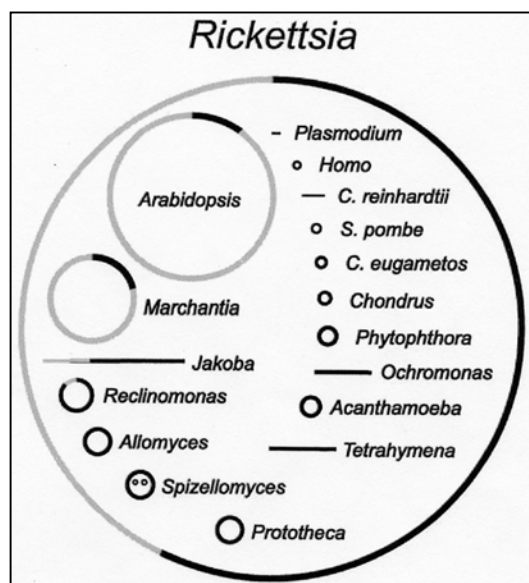


Abb. 1.6.1: Grössenvergleich einiger ausgewählter mtGenome aus Lang *et al.* (1999)

1.7 Eigenschaften pflanzlicher mitochondrialer Genome

Die Struktur der mtDNA in Pflanzen ist bis heute nicht wirklich verstanden. Bei fast allen Metazoen liegt sie als ringförmiges Molekül vor (Wolstenholme 1992). Restriktionskartierungen von pflanzlichen mitochondrialen Genomen deuten auf eine multizirkuläre Struktur hin. Diese teilt sich in ein Hauptgenom auf, welches das gesamte mtGenom repräsentiert, und mehrere Nebengenome, die nur Teile des Genoms enthalten. Haupt- und Nebengenome können miteinander rekombinieren und neue Genomorganisationen erzeugen (Abb. 1.7.1). Ausserdem treten alternative Genanordnungen in substöchiometrischen Mengen auf, die Sublimons genannt werden (Small *et al.* 1987). So können also bestimmte mtGenkonfigurationen in unterschiedlichen

Mengen auftreten (Quetier *et al.* 1977). Ferner sind auch mitochondriale Plasmide entdeckt worden (Smith *et al.* 1987).

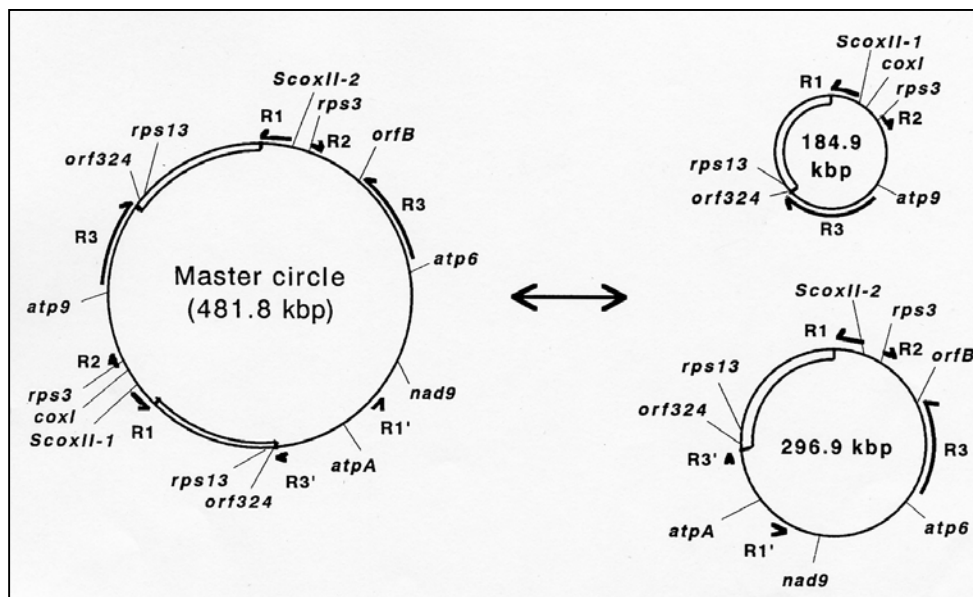


Abb. 1.7.1: Schematische Darstellung der möglichen mtHaupt- und Nebengenome bei einer CMS-Form der Zuckerrübe *Beta vulgaris* aus Kubo *et al.* (1999)

Lediglich in *Brassica hirta* wurde bis jetzt ein Hauptgenom ohne Nebengenome beschrieben. Mit 208 kB ist es das bisher kleinste bekannte mtGenom bei Gefäßpflanzen (Palmer *et al.* 1987). Der Raps, als natürliche Hybride aus *Brassica campestris* und *Brassica oleracea*, sollte das Cytoplasma der Mutterlinie aufweisen. Nach Palmer (1983) unterscheidet sich das *Napus*-Cytoplasma aber so sehr von beiden Eltern, dass die Introgression eines unbekanntes Cytoplasmas während der Evolution von *Brassica napus* vermutet werden kann. Die mtGenomgröße von *Brassica napus* wird auf 221 kB geschätzt. Es werden mögliche Rekombinationspunkte im Abstand von je ca. 10 kB beschrieben, woraus eine grosse Anzahl an Rekombinationseignissen abgeleitet werden kann (Palmer *et al.* 1988).

Bisher war es jedoch nicht möglich, diese Haupt- und Nebengenome zu isolieren oder sichtbar zu machen. Mittels Pulsfeldgelelektrophorese lassen sich zwar DNA-Moleküle von Chromosomengröße trennen, Haupt und Nebengenome können jedoch nicht nachgewiesen werden. Es tritt vielmehr ein Schmier von linearen DNA-Molekülen auf (Backert *et al.* 1995). Die Entdeckung von grossen Bereichen einzelsträngiger DNA innerhalb des mtGenoms von *Chenopodium album* wirft weitere Fragen nach der Struktur auf. Die Autoren fanden mit elektronenmikroskopischen Untersuchungsmethoden grosse Bereiche einzelsträngiger DNA mit Längen zwischen 1,3 und 22,8 kB. Diese werden auf Rekombinations- und Replikationsvorgängen

ge zurückgeführt. Ausserdem fanden sie neben ringförmigen Molekülen rosettenförmige und sigmoide Strukturen, aber keine Hinweise auf Haupt- oder Nebengenome (Backert *et al.* 1997).

Andere Untersuchungen (Bendich 1996) an mtDNA der Pilze *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* sowie in *Brassica hirta* und *Zea mays* wurden unternommen. Mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und Fluoreszenzmikroskopie wurden bei den Pilzen DNA-Fragmente gefunden, die immer deutlich grösser waren, als es die tatsächliche mtGenomgrösse des jeweiligen Organismus erwarten lässt.

In *Brassica hirta* liess sich die von Palmer *et al.* (1987) postulierte zirkuläre DNA nicht nachweisen. In der PFGE wurden Ringe unterschiedlicher Grösse und lineare Fragmente von 50-100 kB Länge, sowie in der Kompressionszone Moleküle von 0,5 bis 1 MB gefunden. Dies entspricht den Ergebnissen bei *Brassica oleracea* und lässt auf eine ähnliche Genomorganisation in subgenomischen Zirkeln schliessen. Statt des Ringmodells wäre nach Bendich (1996) eine Struktur aus Concatameren denkbar, die mit verzweigten Bereichen an der inneren Membran gehalten werden.

Neben den strukturellen Unklarheiten ist die Forschung an pflanzlichen Mitochondrien auch deswegen schwierig, weil in einer Zelle Hunderte bis Tausende von Mitochondrien vorkommen, die sich in ihrer Genomorganisation unterscheiden können. Man untersucht also immer einen Querschnitt eines genetisch höchst variablen Organells. So wäre die Sublimontheorie (Small *et al.* 1987) auch als alternative mtGenomorganisation eines geringen Teils der Mitochondrien interpretierbar.

Über Wechselwirkungen der einzelnen Mitochondrien untereinander ist wenig bekannt. Bei Untersuchungen an der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde herausgefunden, dass Mitochondrien miteinander fusionieren und sich wieder teilen (Nunnari *et al.* 1997) können. Nunnari spricht von einem dynamischen Netzwerk, das ein kontinuierliches Kompartiment bilde, bei dem sich die Proteine, nicht aber die Genome, der beteiligten Mitochondrien mischen, und bei der folgenden Teilung neu organisieren. Inwieweit das auch bei Pflanzen zutrifft, ist noch ungeklärt.

1.8 Molekulare Mechanismen der CMS-Systeme

Der molekulare Mechanismus der CMS ist für einige Systeme mittlerweile geklärt. In der Regel handelt es sich um Änderungen in der mitochondrialen Genorganisation, die z.B. durch Rekombination neue Gene erzeugen, welche transkribiert werden und zu Störungen in den biologischen Prozessen der Mitochondrien führen. Der genaue

Mechanismus, wie das mit der CMS assoziierte Gen bzw. dessen Produkt in den Mitochondrien stört, ist meist unbekannt. Als Möglichkeit wird vermutet, dass das „CMS-Protein“ in die innere Mitochondrienmembran inseriert und damit den zur ATP-Synthese nötigen Protonengradienten stört (Dewey *et al.* 1987, Wise *et al.* 1987).

Die Aufhebung der CMS erfolgt durch Kerngene der Pflanze, wobei man den genauen Mechanismus nicht kennt. Eine beschriebene Möglichkeit besteht im Import eines Proteins, das die Sterilität aufhebt (Cui *et al.* 1996). Eine weitere beruht auf dem Einfluss des Kernhintergrundes, der zu einer veränderten Genexpression in den Mitochondrien führt (Haakansson *et al.* 1991) und die Expression des CMS assoziierten Proteins verhindert. Auch die Deletion der für CMS verantwortlichen Region wurde beobachtet (Mackenzie *et al.* 1988, 1990). Einen guten Überblick zu diesen Mechanismen bietet der Review von Schnable *et al.* (1998)

1.9 Beschreibung ausgewählter CMS-Systeme

Als Beispiel seien im Folgenden die CMS *Texas* in Mais, die CMS *Ogura* in Raps sowie die CMS der Petunie gewählt.

1.9.1 Die CMS *Texas* im Mais

Die CMS *Texas* wurde 1952 von Rogers in Mais beobachtet und beschrieben (Rogers *et al.* 1952). Dewey *et al.* (1986) fanden in den sterilen Pflanzen ein offenes Leseraster (T-urf13) von 345 Nukleotiden Länge, das ein Mosaik anderer mitochondrialer Gene und Bereiche darstellt (Abb. 1.9.1).

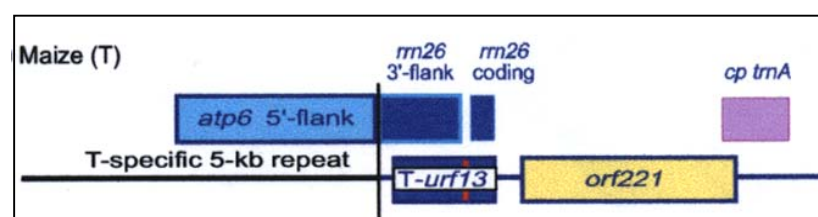


Abb. 1.9.1: Organisation der T-urf13 Region der Mais CMS *Texas* aus Schnable *et al.* (1998)

Dieser T-urf13 kodiert ein 13 kDa-Protein, das nur in den männlich sterilen Pflanzen gefunden wird (Forde *et al.* 1980). Die Wirkung dieses Proteins in den Mitochondrien ist immer noch ungeklärt. Jedoch sprechen viele Fakten dafür, dass es die Ursache der CMS ist:

- a) Das Protein wurde in den Tapetumzellen der Antheren gefunden (Hack *et al.* 1991). Diese sind wichtig für die Ernährung der sich differenzierenden Pollenvor-

läuferzellen. Die Zerstörung der Tapetumzellen führt bei Raps und Tabak zu männlicher Sterilität (Mariani *et al.* 1990).

- b) Die Anzahl der Mitochondrien nimmt vor dem Tetradenstadium in den Tapetumzellen um das Vierzigfache zu, gleichzeitig nimmt ihr Volumen um das bis zu Fünzfache ab (Lee *et al.* 1979, Warmke *et al.* 1978). Diese enorme Aktivität könnte die Mitochondrien in der CMS *Texas* eventuell unter Stress setzen, an dem sie zugrunde gehen, was zum Absterben der Antheren führt
- c) CMS *Texas* Calli, die in Anwesenheit von T-Toxin (s.u.) kultiviert wurden, überlebten nur, wenn sie das T-urf13-Gen verloren hatten. Damit einher ging der Verlust der männlichen Sterilität (Gengenbach *et al.* 1975, Fauron *et al.* 1987).
- d) Trotz intensiver Forschung wurde bisher keine Pflanze gefunden, die männlich steril und T-Toxin resistent wäre. Dies spricht dafür, dass der Auslöser für die T-Toxinsensitivität und für die männliche Sterilität der gleiche ist, nämlich T-urf13.

Für die CMS *Texas* sind Restorer Gene beschrieben worden, welche die Sterilität wieder aufheben. Die vollständige Wiederherstellung der Fertilität ist an das Vorhandensein der beiden dominanten Kern Gene Rf1 und Rf2 gebunden. Anstelle von Rf1 können auch die Restorer Gene Rf8 und Rf* treten.

Die Restauration findet im diploiden Sporophytengewebe statt, so dass auch eine für die Restorer heterozygote Pflanze vollständig restauriert wird (Laughnan *et al.* 1983). Die Eigenschaften beider Restorer sind sehr verschieden. Das Genprodukt von Rf2 besitzt eine 75%ige Ähnlichkeit mit der Aldehyddehydrogenase bei Säugern und hat möglicherweise eine ähnliche Funktion (Cui *et al.* 1996).

Rf1, Rf8 und Rf* wirken dagegen auf der Transkriptionsebene. Sie führen dazu, dass die für die CMS *Texas* typischen Transkripte des T-urf13 am 5'-Ende modifiziert werden, wodurch trunkeerte Formen unterschiedlicher Länge entstehen. Rf1 kann zu einer Reduktion an T-urf13 von 80% führen. Allerdings kommt es auch vor, dass weiterhin zusätzlich reife Transkripte auftreten (Dewey *et al.* 1987, Forde *et al.* 1980, Wise *et al.* 1999).

Ein sehr gut untersuchter Nebeneffekt, der mit dem Vorhandensein dieses T-urf13-Proteins einhergeht, ist die Empfindlichkeit gegenüber dem T-Toxin der Schadpilze *Bipolairs maydis* T-Rasse und *Phyllosticta maydis*. Normaler Mais wird durch diese beiden Pilzen wenig geschädigt, wohingegen der CMS *Texas* Mais vollständig ab-

stirbt. Dies führte Anfang der 70er Jahre zu einem Ernteausschlag beim Mais von 17%, einem Schaden von ca. 1 Milliarde US-\$ und zum Zusammenbruch des auf der CMS *Texas* beruhenden Maisanbaus in den USA (Tatum 1971). Die Ursache für die Empfindlichkeit des CMS *Texas* Mais liegt daran, dass das T-urf13-Protein ein Tetramer mit einem zentralen geschlossenen Porenbereich in der inneren Mitochondrienmembran bildet (Abb. 1.9.2). Durch die Bindung des T-Toxins scheint es zu einer Konformationsänderung zu kommen, so dass die Pore geöffnet wird (Korth *et al.* 1991, Rhoads *et al.* 1994). Es kommt zu einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, zur Freisetzung von Ca^{2+} und NAD^+ und zum Absterben der Mitochondrien (Pring *et al.* 1989).

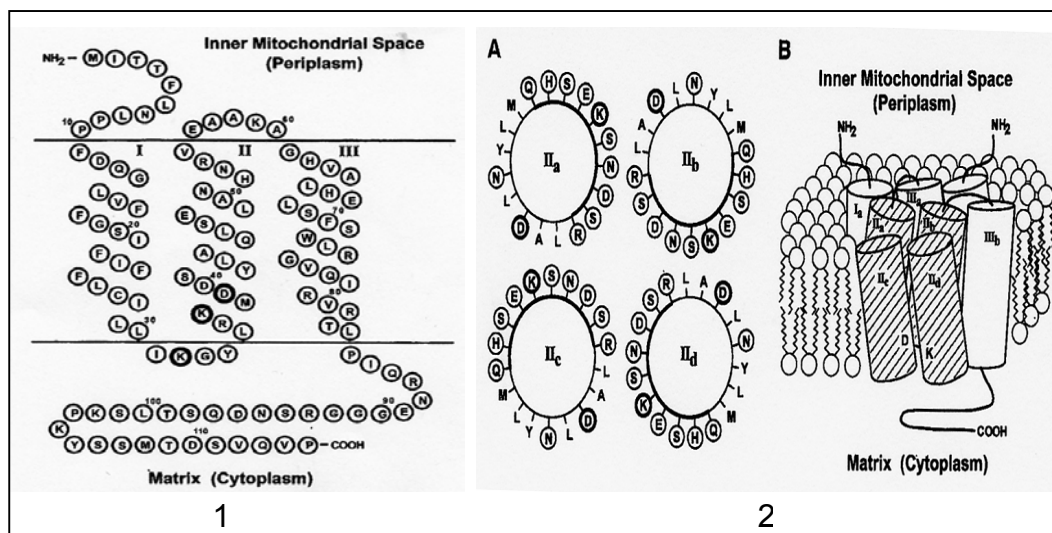


Abb. 1.9.2: Mögliche Struktur und Position des T-urf13-Proteins in der inneren Mitochondrienmembran. (1) Position des T-urf13-Monomers in der Membran, (2) Mögliche Anordnung des T-urf13-Tetramers aus (1) Korth *et al.* (1991), (2) Rhoads *et al.* (1994)

1.9.2 Die CMS *Ogura* des Raps

Die CMS *Ogura* wurde 1968 von Ogura im Rettich entdeckt (Ogura 1968). Bannerot *et al.* (1974) und Pelletier *et al.* (1983) überführten und verbesserten das Cytoplasma in *Brassica oleracea* und von da in *Brassica napus*. Interessant an dem CMS-System ist seine Beeinflussbarkeit durch die Umgebungstemperatur (Polowick *et al.* 1987). Bei Temperaturen von 23 bis 28°C bildet die männlich sterile Blüte Staubfäden und Staubbeutel mit sporogener Gewebsentwicklung bis zur Mikrospore (S. 62, Abb. 4.4.1). Bei Temperaturen von 18°C bis 23 °C werden Mischformen aus Staubblättern und Fruchtknoten gebildet. Die sporogene Gewebsentwicklung reicht nur bis zum Tetradenstadium. Bei Temperaturen von 15 bis 18°C sind die Staubblätter fast voll-

ständig in fruchtknotenähnliche Gebilde umgewandelt, sporogenes Gewebe kann nicht mehr gefunden werden.

Auf molekularer Ebene wurde ein Orf 138 identifiziert, der mit der männlichen Sterilität assoziiert wird. Er kann in drei Konformationen vorliegen, wobei eine davon in den fertilen Revertanten auftritt (Bonhomme *et al.* 1991, 1992; Abb. 1.9.3).

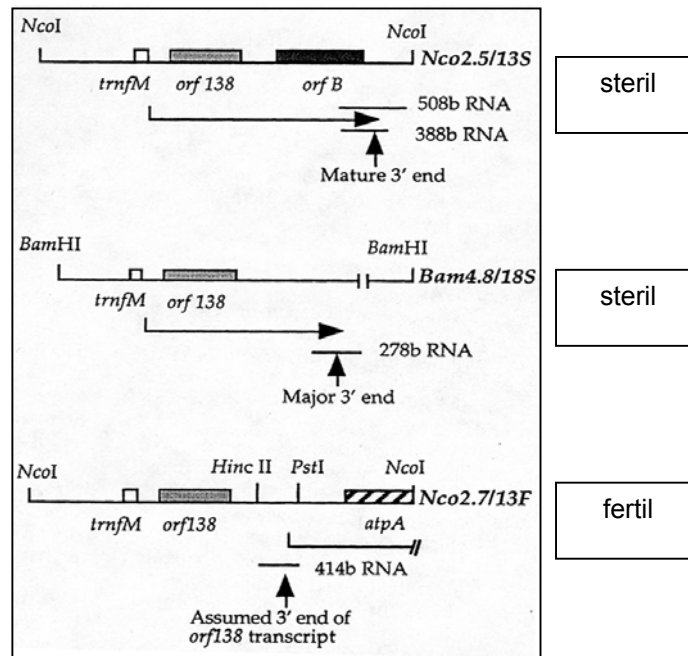


Abb. 1.9.3: Schema der Genorganisation und der Transkription des Orf138 der CMS *Ogura* im Raps. nach Bellaoui *et al.* (1997)

Die verschiedenen Konformationen führen dazu, dass die 3'-Bereiche unterschiedlich prozessiert werden. In der fertilen Revertante lässt sich keine Orf 138-mRNA nachweisen, die Stabilität der 13S-Form ist gegenüber der 18S-Form reduziert. Dennoch induzieren 13S und 18S die männliche Sterilität (Bellaoui *et al.* 1997; Abb. 1.9.4).

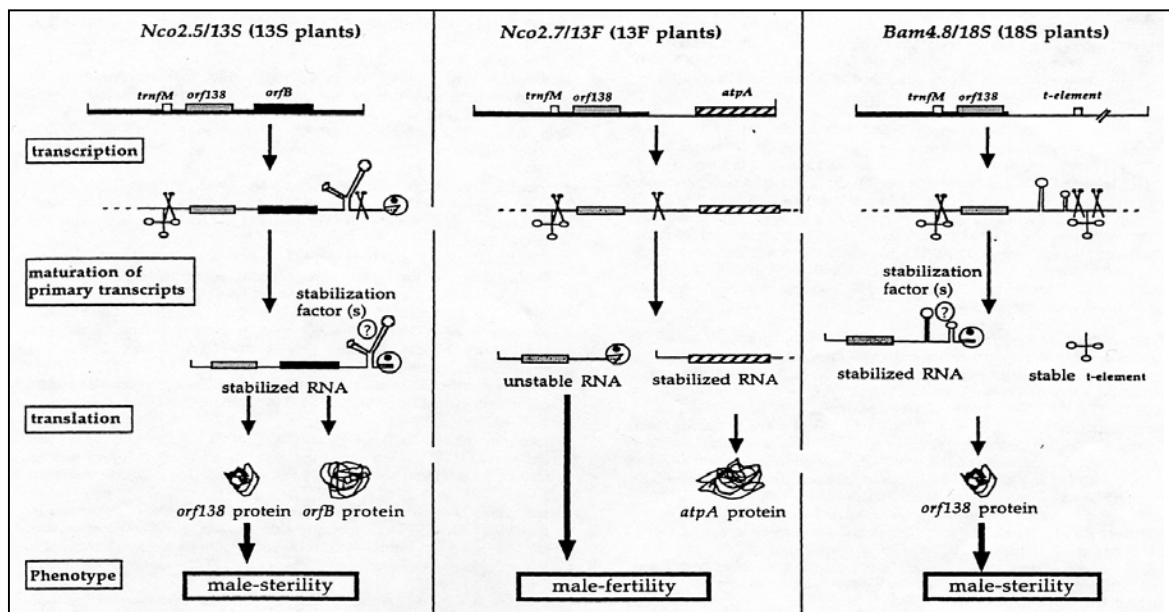


Abb. 1.9.4: Schema der Orf138-Transkriptprozessierung der CMS *Ogura* im Raps.
S = sterile, F = fertile Form
nach Bellaoui *et al.* (1997)

Orf 138 kodiert für ein 20 kDa Protein, das in den sterilen Pflanzen nachgewiesen werden kann und in den restaurierten Linien gewebsspezifisch signifikant reduziert ist (Grelon *et al.* 1994, Krishnasamy *et al.* 1994).

Durch Einkreuzung von Restorer genen aus dem Rettich in den Raps konnten restaurierte Pflanzen erzeugt und verbessert werden. Die Restauration wird auf ein einziges Kerngen (*Rfo*) zurückgeführt, das noch nicht charakterisiert wurde (Heyn 1976, Pelletier *et al.* 1987, Delourme *et al.* 1991). Bellaoui *et al.* (1999) konnten zeigen, dass bei den restaurierten Pflanzen die Menge an Orf 138-mRNA im Vergleich zu den sterilen Pflanzen unverändert ist, die Orf 138-Proteinmenge aber deutlich reduziert ist. Eine posttranslationale Regulation durch den Restorer in Form einer unbekannten Protease wird von den Autoren für möglich gehalten.

1.9.3 Die CMS der Petunie

Die CMS der Petunie entstand spontan durch die Kreuzung von Petunienwildarten mit einer Kultursorte (Izhar 1984). Die Ausprägung der CMS erfolgt wie in der CMS Texas des Mais in den Tapetumzellen der Antheren. Im Vergleich zu den fertilen Pflanzen erscheinen die Mitochondrien in den sterilen Pflanzen geschwollen (Bino 1985). Im Verlauf der Pollenentwicklung degenerieren die Konnektive der Antheren nicht, was normal wäre, sondern häufen Zellmaterial an. Die Antheren enthalten bei

Reife und Aufbruch keinen fertilen Pollen mehr (Conley *et al.* 1994). Als Ursache wird das mitochondriale Mosaikgen „*pcf*“ genannt. Dieses besteht aus Teilen mehrerer anderer kodierender Regionen mitochondrialer Gene (Abb. 1.9.5).

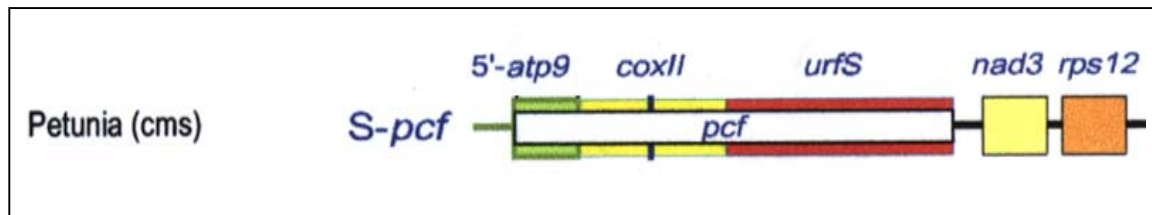


Abb. 1.9.5: Organisation der S-pcf-Region der Petunien CMS aus Schnable *et al.* (1998)

Die Transkription erfolgt als Kotranskript bestehend aus *pcf-nad3-rps12*. In den pflanzlichen Geweben lassen sich verschiedene *pcf*-Transkripte nachweisen, allerdings tritt das für die CMS verantwortliche 5'-*urfS*-Transkript nur in den Knospen auf (Hanson *et al.* 1996).

Ein gegen die *urfS*-Region gerichteter Antikörper detektiert ein 55 kDa Precursorprotein, das zu einem 25 kDa Protein prozessiert wird. Es wird nur in den sterilen Linien exprimiert und ist in den restaurierten Linien stark reduziert. Das 25 kDa Protein lässt sich in der löslichen und in der Membranfraktion der Mitochondrien nachweisen. Der *coxII*-Bereich des S-*pcf*-Gens wird zwar im *E.coli*-Versuchssystem translatiert, aber in den Mitochondrien lässt er sich nicht nachweisen (Nivison *et al.* 1989, 1994).

Die Restauration erfolgt durch ein einzelnes dominantes Gen (*Rf-PPR592*). Es wurde von Bentolila *et al.* (2002) als Gen, das für ein PPR-Protein kodiert, identifiziert.

PPR steht für „Pentatricopetide repeat“ und bezeichnet einen degenerierten 35 Aminosäuren langen Repeat, der zwei α -Helices bildet, die durch einen Loop miteinander verbunden sind. Mehrere (2-26) dieser Repeats können zusammen verschieden lange PPR-Proteine bilden. Ihre Funktion ist unklar, aber es wird eine Verwandtschaft zu den „Tetratricopeptide repeat proteins (TPR)“ vermutet, die eine Proteinbindedomäne besitzen (Small *et al.* 2000). Es scheint sich bei den PPR-Proteinen um eine Multigenfamilie mit mehr als 200 Mitgliedern zu handeln. Von 58 analysierten PPR-Proteinen weisen 52 mitochondriale und sechs chloroplastidäre Leitsequenzen auf (Aubourg *et al.* 2000).

Das Restorer gen der Petunie kodiert 592 Aminosäuren und besteht aus 14 Wiederholungen des 35 Aminosäuren umfassenden PPR-Motivs. Ferner besitzt es eine 28 Aminosäuren lange mitochondriale Leitsequenz. Mit dem Restorer gen transformierte männlich sterile Petunien wurden fertil, gleichzeitig konnte eine starke Abnahme des *pcf*-Proteins beobachtet werden. Die Strukturähnlichkeit der PPR-Proteine mit den

Proteinbindedomäne-TPR-Proteinen und die Reduktion des PCF-Proteins in den restaurierten Linien legt eine posttranslationale Regulation der CMS in Petunie nahe.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, zur weiteren Aufklärung der Cytoplasmatischen Männlichen Sterilität des Raps (*Brassica napus* L.) beizutragen. Da *Arabidopsis thaliana* als *Brassicaceae* das nächst verwandte bekannte mtGenom zu *Brassica napus* darstellt, erscheint es sinnvoll, sich bei der Analyse der CMS-Systeme in *Brassica napus* daran zu orientieren.

Mittels RAPD-, RFLP- und Transkriptionsanalyse sollen die Gene, die das mitochondriale Genom kodiert und die an der Atmungskette beteiligt sind, untersucht werden. Dies sind in *Arabidopsis thaliana* (Marienfeld *et al.* 1999):

- NADH-Dehydrogenase (Komplex I): nad1-4, nad4L, nad5-7 und nad9
- Succinatdehydrogenase (Komplex II): sdh4
- Cytochrom c Reduktase (Komplex III): cytb
- Cytochrom c Oxidase (Komplex IV): cox1-3
- F0/F1-ATPase (Komplex V): atp6, atp8, atp9
- Cytochrom c Biogenese: ccb203, ccb206, ccb256, ccb382, ccb452

Die Relevanz des von Landgren *et al.* (1996) für die CMS *Tournefortii* verantwortlich gemachten Orf 263 soll in der vorliegenden CMS *Tournefortii* „Stiewe“ untersucht werden.

Darüber hinaus wird mittels Transkriptanalyse nach unbekanntem, kotranskribierten Genen gesucht, die mit der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ assoziiert sein könnten.

Abschliessend soll anhand der erhaltenen Daten der Grad der Übereinstimmung in der mitochondrialen Genomorganisation verschiedener *Brassicaceae* bzw. der CMS-Systeme *Tournefortii* „Stiewe“, *Juncea* und *Tokumasu* bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien hatten die Qualitätsbezeichnung „p.a.“ oder „molecular biology grade“ und stammen von folgenden Firmen: Boehringer, Mannheim; Biorad, USA; GibcoBRL, USA; Carl Roth GmbH; Karlsruhe; Fluka, USA; ICN, USA; Promega, USA; Sigma Aldrich, USA; Merck, Darmstadt

2.2 Pflanzenmaterial

Saatgut der Sommerrapsorten „Duplo“, „Yudal“ und „Mangun“ wurde von Prof. Dr. H. Becker, Dr. W. Ecke, Dr. C. Möllers (Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen) und die Sorte „Andor“ von Dr. M. Albaum (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Es bestand aus der männlich sterilen Form CMS *Tournefortii* (BC₄) „Stiewe“ in der Sorte „Duplo“, dem fertilen Maintainer in Form eines Dihaploiden „Duplo“ (Universität Göttingen), sowie den CMS-Systemen *Juncea* und *Tokumasu* (BC₃) in der Sorte „Andor“ und einem Maintainer derselben Sorte (Universität Hamburg, Albaum *et al.* 1995). Die CMS *Tournefortii* „Stiewe“ geht auf die durch asymmetrische Protoplastenfusion zwischen *Brassica napus* „Duplo“ (Kerndonor) und *Brassica tournefortii* (Gouan) (Cytoplasmadonor) entstandene Linie 25-143 von Stiewe (Stiewe 1993, Stiewe und Röbbelen 1994) zurück. Die CMS *Tokumasu* (Tokumasu 1951) wurde durch interspezifische Kreuzung zwischen *Brassica napus* und *Raphanus sativus* mittels Embryoisolation erzeugt (Paulmann und Röbbelen 1988).

Die CMS-Linie *Juncea* geht auf Rawat (Rawat *et al.* 1979) zurück. Den Sorten „Yudal“ und „Mangun“ werden Restorereigenschaften für die CMS *Tournefortii* zugeschrieben (Sodhi *et al.* 1994). Sie wurden mit der CMS *Tournefortii*, CMS *Juncea* und CMS *Tokumasu* gekreuzt, restaurierte Pflanzen isoliert und mit der sterilen Mutterlinie weiter rückgekreuzt. *Brassica tournefortii* (Gouan) Saatgut unterschiedlicher Herkünfte (Sortimentsnummern K 9675 und K 8812) wurde vom „Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben“ erhalten. Für den Southernblot wurden Mitochondrien aus *Brassica oleracea* var. *acephala* unbekannter Sorte isoliert. Das verwendete *Arabidopsis*-Material stammt aus einer Zellsuspensionskultur des Typen C24. Für die Northernanalyse wurden ganze Blütenstände von *Arabidopsis thaliana* C24 genutzt.

2.2.1 Herstellung männlich steriler, fertiler und restaurierter Linien

Die CMS *Tournefortii*-Linie („D34-2“) wurde mit dem dihaploiden Maintainer „Duplo“, („DH1“) bis zur BC₈ vermehrt, die CMS *Juncea*-Linie („A102“) und die *Tokumasu*-Linie („A32“) mit dem Maintainer „Andor“ („A2“) bis zur BC₆. Die fertilen Nachkommen der Kreuzung zwischen den Linien „D34-2“ und dem Restorer „Yudal“ wurden mit der Linie „D34-2“ bis zur BC₄ rückgekreuzt. Die restaurierten Pflanzen wurden bei der ersten Blüte auf Fertilität oder Sterilität bonitiert, heruntergeschnitten und nach erneutem Aufblühen ein weiteres Mal bonitiert.

2.2.2 Anzuchtbedingungen und Vermehrung des Pflanzenmaterials

Alle Pflanzen wurden in Fruhstorfer Einheitserde P ausgesät, und im Keimlingsstadium in Fruhstorfer Einheitserde T pikiert. Die Kultur erfolgte in klimatisierten Kammern bei 22°C Tages- und 18°C Nachttemperatur. Der Hell-/Dunkelrhythmus betrug 16/8 Stunden.

Die restaurierten Kreuzungen wurden in kleinen Töpfen mit Perlite kultiviert, die etiolierten Keimlinge wurden in Schalen mit Perlite unter Lichtabschluss 5 bis 6 Tage angezogen, Blütenknospen adulter Pflanzen wurden nach acht bis zwölf Wochen geerntet.

2.3 Aufreinigung von Mitochondrien aus verschiedenen *Brassicaceae*.

Die Mitochondrien wurden wie bei Mihr *et al.* (2001) beschrieben aufgereinigt. Das Pflanzenmaterial wird in einem Küchenmixer homogenisiert; Plastiden, Zellkerne und andere subzelluläre Bestandteile mittels differentieller Zentrifugation entfernt und die Mitochondrienfraktion abschliessend über einen Percoll-Stufengradienten gereinigt und konzentriert. Die Reinheit der Mitochondrienfraktion wurde durch Auftrennung mittels BN-PAGE (Schägger *et al.* 1991) ermittelt, indem das Ausmass chloroplastidärer Kontamination anhand der Menge der grossen Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase abgeschätzt wurde.

2.4 Isolierung von DNA und RNA aus Rapsmitochondrien

DNA-Isolierung:

50–100 mg der aufgereinigten Mitochondrien wurden in 1 mL Lysispuffer resuspendiert und eine Stunde bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Anschliessend wurde die Probe mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (C/I) 24:1 versetzt und gemischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14 000 rpm in einer Eppendorf-

Tischzentrifuge bei Raumtemperatur. Die oberste Phase wurde abgenommen und erneut mit C/I gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Anschliessend wurde für mindestens fünf Minuten, bzw. bis ein Pellet sichtbar wurde, bei 14 000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µL Hochsalz-TE-Puffer aufgelöst und mit zwei Volumina eiskaltem Ethanol (abs.) gemischt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 bis 30 min und anschliessend wurde für 15 min bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschliessend wurde es in 50µL ddH₂O aufgenommen und die Konzentration mittels „Fluorescent DNA Quantitation Kit“ der Firma Bio-Rad an einem Bio-Rad „VersaFluor Fluorometer“ bestimmt. Alternativ wurde ein EtBr-Agarosegel hergestellt, die Proben und die „Low DNA Mass™ Ladder“ der Firma GibcoBRL® als Standard geladen und nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Fluoreszenz-Laserscanner „FLA 3000“ der Firma Raytest gescannt. Mittels der „AIDA Software“ wurde eine densitometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

Lysispuffer:

0,8 M Guanidin-HCL; 1% Triton X-100; 0,2 mg/mL Proteinase K, 1 mM EDTA

Hochsalz-TE-Puffer:

1 M NaCL; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA

RNA-Isolierung:

50 mg Mitochondrien wurden in 200 µL RNA-Lysispuffer „RA1“ des „NucleoSpin® RNA Plant Kits“ der Firma Macherey und Nagel/Düren lysiert. Anschliessend wurde 1 mL „peqGOLD Trifast™“ der Firma peqLab Biotechnologie GmbH/Erlangen dazugegeben und nach beigefügtem Protokoll weiterverfahren. Die gewonnene RNA wurde in 50 µL DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration mittels Messung der optischen Dichte ermittelt. Diese RNA wurde für Northernblots eingesetzt. Für RT-PCR und ähnliche Verfahren wurde sie zusätzlich mittels „NucleoSpin® RNA Plant Kit“ der Firma Macherey und Nagel nach Protokoll aufgereinigt.

2.5 Reinigung von PCR-Produkten aus EtBR-Agarosegelen

Alle zu reinigenden PCR-Produkte wurden auf 1,5-3 %igen EtBr-Agarosegelen in 1xTAE-Puffer (Sambrook *et al.* 1989) bei 3-5 V/cm aufgetrennt, ausgeschnitten, mittels „NucleoSpin® Extract 2 in 1“ von Macherey und Nagel isoliert und die Konzentration, wie in 2.4 beschrieben, bestimmt.

2.6 PCR zum Nachweis des Orf 263

Anhand der von Landgren *et al.* (1996) veröffentlichten Sequenz für den Orf 263 im 3'-Bereich von *atp6* wurden mittels des „PRIME3“-Programms die Primer FATP6, FORF263², und RORF263² abgeleitet und jeweils eine PCR mit den Primern FATP6/RORF263² und FORF263²/RORF263² mit Gesamt-DNA, die mittels CTAB Methode (Rogers *et al.* 1994) der Sorten *Brassica napus* „Duplo“ („DH1“) fertil (Maintainer) und CMS *Tournefortii* männlich steril („D34-2“), *Brassica napus* „Andor“ fertil („A2“) (Maintainer) und CMS *Juncea* männlich steril („A102“), *Brassica tournefortii* fertil, *Brassica napus* „Mangun“ und „Yudal“ fertil (mögliche Restorer) durchgeführt. Als DNA-Polymerase wurde die „RedTaq®“ der Firma Sigma sowie der beigefügte 10X Puffer mit MgCl₂ verwendet. Als PCR-Gerät diente ein „TGradient Block“ der Firma Biometra®. Die erhaltenen Produkte wurden wie unter 2.9.1 beschrieben kloniert und bei SeqLab/Göttingen sequenziert.

PCR-Ansatz:

Mitochondriale DNA	50 ng
F _{orward} -Primer	10 pmol
R _{everse} -Primer	10 pmol
dNTPs	200 µM je dNTP
MgCl ₂	2 mM
10X RedTaq-Puffer	5 µL
RedTaq	1,5 U
ddH ₂ O	ad 50 µL

PCR-Programm:

Denaturierung	95°C	1 min
Primerannealing	56°C	1 min
Elongation	72°C	1 min
<i>2 Zyklen</i>		
Denaturierung	95°C	1 min
Primerannealing	53°C	1 min
Elongation	72°C	1 min
<i>30 Zyklen</i>		
Elongation	72°C	5 min
Kühlen	4°C	

2.7 Southernblotanalyse

Für die Southernblotanalyse (Southern 1975) wurde mitochondriale DNA von *Arabidopsis thaliana* C24, *Brassica tournefortii* (Gouan), *Brassica napus* „Duplo“ fertil („DH1“), *Brassica napus* „Duplo“ CMS *Tournefortii* „Stiewe“ („D34-2“), männlich steril,

Brassica napus „Andor“ („A2“) fertil, *Brassica napus* „Andor“ CMS *Juncea* („A102“), männlich steril, *Brassica napus* „Andor“ CMS *Tokumasu* („A32“), männlich steril, und Weisskohl eingesetzt.

Um eine Abschätzung der Schnittfrequenz zu treffen, wurde das mitochondriale Genom von *Arabidopsis thaliana* in 20 kB grosse Stücke unterteilt und diese mittels „Restriction Enzyme Analysis Program“ aus dem Internet für diverse Restriktionsenzyme untersucht. Darauf erfolgte die Auswahl der Restriktionsenzyme in „häufig“, „oft“, „mittel“ und „selten“ schneidende Restriktionsenzyme. Folgende Auswahl wurde getroffen: DpnII (I/GATC), Apol (R/AATTY), EcoRI (G/AATTC), XmaI (C/CCGGG), alle von NEB, BsrBRI (GATNN/NNATC) von Promega und BstXI (CCANNNNN/NTGG) von MBI Fermentas.

Die mitochondriale DNA wurde mit einem 50fachen Restriktionsenzymüberschuss, gemäss Herstellerangaben geschnitten, mit Ethanol präzipitiert und in ddH₂O aufgenommen. 100 ng der restringierten Proben und 8 µL Digoxigenin markierte DNA-Grössenstandard III (Fragmentgrössen 21,22; 5,15; 4,97; 4,27; 2,02; 1,95; 1,58; 1,38; 0,95; 0,83 kB) von Roche wurden auf ein 1%iges Agarosegel geladen und in 1XTAE-Puffer 16 Stunden bei 1,2 V/cm aufgetrennt. Anschliessend wurde das Gel wie im „Digoxigenin“-Handbuch der Firma Roche beschrieben behandelt und mit einer „VacuGene XL“-Blotvorrichtung und einer „VacuGene Pump“, beides Pharmacia LKB, bei 65 mbar für 1,5 Stunden auf „Nytran®SuperCharge“ Nylontransfermembran der Firma Schleicher und Schuell geblottet. Die DNA wurde dann durch UV-Kreuzvernetzung an die Membran gebunden. Dazu wurde ein UV-Transilluminator von Bachofer mit einer Wellenlänge von 302 nm verwendet. Der Blot wurde auf feuchtes Filterpapier gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und mit der Oberseite nach unten auf einen 3 mm dicken Plexiglastisch, der sich 4,5 cm über dem Transilluminator befand, gelegt und drei Minuten belichtet. Anschliessend wurde der Blot in ddH₂O abgespült und für die Hybridisierung eingesetzt.

Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion wurden wie im Handbuch beschrieben mit Reagenzien der Fa. Roche durchgeführt, allerdings wurde das „Anti-Digoxigenin-AP Fab“ Fragment in einer Verdünnung von 1:15 000 eingesetzt und das Substrat „CDP-Star®“ von Applied Biosystems 1:100 verdünnt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in Hybridisierungsröhrchen im Hybridisierungsofen von Hybaid. Die Ergebnisse der Hybridisierungen wurden auf Unterschiede zwischen den Arten und Sorten untersucht.

2.8 Northernblotanalyse

Für die Northernblotanalyse wurde mitochondriale DNA von *Arabidopsis thaliana* C24, *Brassica tournefortii* (Gouan), *Brassica napus* „Duplo“ (DH1), fertil, *Brassica napus* „Duplo“ CMS *Tournefortii* „Stiewe“ („D34-2“), männlich steril, *Brassica napus* „Andor“ („A2“) fertil, *Brassica napus* „Andor“ CMS *Juncea* („A102“), männlich steril, *Brassica napus* „Andor“ CMS *Tokumasu* („A32“), männlich steril, sowie mitochondriale RNA aus Blütenknospen von fertilen (D34-RF) und sterilen (D34-RS) Nachkommen der Kreuzung von „D34-2“ mit dem Restorer „Yudal“ eingesetzt. Bei *Brassica tournefortii* (Gouan) konnten keine Knospen in ausreichender Anzahl gewonnen werden, so dass nur etiierte Keimlinge analysiert wurden. Von *Arabidopsis thaliana* wurde entweder mitochondriale RNA aus Zellkulturmaterial oder Gesamt-RNA aus Blütenständen verwendet. Zur Untersuchung von Expressionsunterschieden bei *atp6* und *atp9* wurde ausserdem mitochondriale RNA aus etiierten Keimlingen von *Brassica napus* „Duplo“ fertil („DH1“), fertil, *Brassica napus* „Duplo“ CMS *Tournefortii* („D34-2“), männlich steril, *Brassica napus* „Andor“ („A2“) fertil, *Brassica napus* „Andor“ CMS *Juncea* („A102“), männlich steril, *Brassica napus* „Andor“ CMS *Tokumasu* („A32“), männlich steril eingesetzt. Es wurden je 50-100 ng RNA geladen und vier bis sechs Stunden bei 3,3 bis 4 V/cm elektrophoretisch getrennt. Als Grössenstandard dienten 80 ng des Digoxigenin-markierten RNA-Längenstandards I von Roche (Fragmentgrössen: 6948, 4742, 2661, 1821, 1517, 1049, 575, 438, 310 Basen). Probenvorbereitung, Gellauf, Blotprozedur und Hybridisierung wurden entsprechend dem „Digoxigenin“-Handbuch von Roche durchgeführt. Allerdings wurde abweichend mit Vakuum geblottet und der Laufpuffer sowie das 1,5%iges Agarosegel enthielten 2% Formaldehyd. Die Blots wurden anschliessend auf Unterschiede der Transkripte zwischen den männlich sterilen und fertilen Pflanzen untersucht.

2.9 Herstellung mtGensonden für Southern- und Northernblot

2.9.1 Primer- und Sondendesign

Für die Ableitung der Primer zur Sondenherstellung wurden das mitochondriale Genom von *Arabidopsis thaliana* (S. 93, Genbankeintrag 1 [Gbe.]) bzw. bereits veröffentlichte mitochondriale Sequenzen von *Brassica napus* (S.93, Gbe.2) verwendet. Aus den entsprechenden Genbereichen wurden mittels „Prime3“-Programm Primer abgeleitet (S. 81, 7.2). Die Primer wurden bei Sigma® ARK synthetisiert und eine PCR mit dem Maintainer „DH1“ als Template auf einem „DNA Thermal Cycler“ von

Perkin Elmer Cetus durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden wie beschrieben aufgereinigt, mit T4 DNA-Ligase (Promega) in den „pGem®T“-Vektor der Firma Promega nach Protokoll ligiert und anschliessend in *E. coli* „XL1 Blue“ durch Hitzeschock transformiert. Die Klone wurden auf LB-Ampicilin-X-Gal-IPTG-Agar ausplattiert und ein Blau-Weiss-Screening durchgeführt. Positive Klone wurden mittels PCR verifiziert. Dafür wurden T7- und SP6-Primer, deren Sequenzen sich 5' und 3' der Klonierungsstelle befinden, oder eine Kombination aus genspezifischen Primern verwendet. Aus den positiven Klonen wurde das Plasmid mittels „Nucleospin Plasmid“ von Macherey und Nagel isoliert und zur Sequenzierung an die Firma GATC-Biotech AG/Konstanz geschickt. Die erhaltenen Sequenzen (S. 86, 7.2) wurden mit denen aus *Arabidopsis thaliana* verglichen und als Grundlage für die Sondenherstellung benutzt. Später wurde auf die Klonierung verzichtet und die Sonden direkt mittels genspezifischer Primer aus mitochondrialer DNA amplifiziert und markiert.

Der PCR-Ansatz zur Genamplifikation wurde wie unter 2.6 beschrieben durchgeführt. Da die Primer Annealingtemperaturen von 56°C bis 62°C hatten, wurde eine Touch-Down-PCR gewählt (Don *et al.* 1991; Hecker *et al.* 1996), um möglichst viele Gene gleichzeitig zu amplifizieren. Für die Southern- und Northernanalyse wurden insgesamt 28 mitochondriale Sonden amplifiziert und kloniert und für die Hybridisierung verwendet. Für das Screening der Klone wurden diese mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, in das PCR-Reaktionsgefäss gestrichen und der PCR-Ansatz dazu gegeben. Es wurde ein PCR-Ansatz wie in 2.6 beschrieben gewählt, allerdings wurde er in 20 µL durchgeführt und die Reagenzien entsprechend reduziert.

PCR-Programm:

Denaturierung 95°C 1 min
Einmal

Denaturierung 95°C 1 min
Primerannealing 60°C 1 min
Elongation 72°C 1 min
2 Zyklen

Denaturierung 95°C 1 min
Primerannealing 58°C 1 min
Elongation 72°C 1 min
2 Zyklen

Denaturierung 95°C 1 min
Primerannealing 56°C 1 min
Elongation 72°C 1 min
30 Zyklen

Elongation	72°C	5 min
Kühlen	4°C	

PCR-Programm für das Klonscreening:

Denaturierung	95°C	1 min
<i>Einmal</i>		

Denaturierung	95°C	45 sec
Primerannealing	58°C	1 min
Elongation	72°C	1 min
<i>35 Zyklen</i>		

Elongation	72°C	5 min
Kühlen	4°C	

2.9.2 Markierung der Sonden

Als Grundlage für die Sondenmarkierung diente das „Digoxigenin“-Benutzerhandbuch der Firma Roche.

Die Markierung der Sonden wurde mit den genspezifischen Primern und 200 pg Plasmid als Template durchgeführt. Es wurde ein Standard PCR-Ansatz wie in 2.5 beschrieben verwendet, ausser dass die Nukleotide je auf 100 µM konzentriert waren und zur Markierung Digoxigenin-11-2'-deoxy-Uridin-5'-Triphosphat, alkalilabil, verwendet wurde. Das Verhältnis von Digoxigenin-11-dUTP/dTTP betrug 17,5 µM Digoxigenin-11-dUTP/82,5 µM dTTP. Die Markierungs-PCR wurden in einem „DNA Thermal Cycler“ von Perkin Elmer Cetus durchgeführt. Die Sonden rpl5, rps3, 5'atp9-2 und 5'atp9-2a wurden direkt mit dem Markierungsmix aus mitochondrialer DNA amplifiziert und wie beschrieben aufgereinigt.

Die Markierungseffizienz wurde auf einem Agarosegel abgeschätzt und in einer Konzentration von 2 µL/mL Hybridisierungslösung im Southern- und Northernblot eingesetzt.

Markierungs-PCR:

Denaturierung	95°C	1 min
<i>Einmal</i>		

Denaturierung	95°C	1 min
Primerannealing	58°C	1 min
Elongation	72°C	1 min
<i>30 Zyklen</i>		

Elongation	72°C	5 min
Kühlen	4°C	

2.10 Sondenüberspannende PCR

Um eine weitere Charakterisierung der Rapsgenome untereinander und zu *A. thaliana* zu erreichen, wurden anhand des mitochondrialen Genoms von *Arabidopsis thaliana* diejenigen Sondenprimer miteinander kombiniert, bei denen die Sonden im Abstand von bis zu ca. 10 kB lagen, und bei denen eine Amplifikation in der PCR ohne Probleme zu erwarten war. Dabei wurde *Arabidopsis thaliana* als Kontrolle für die zu erwartenden Fragmente benutzt. Die PCR wurde in 20 µL angesetzt und in einem Perkin Elmer Cetus PCR-Gerät durchgeführt.

PCR-Ansatz:

Mitochondriale DNA	20 ng
F _{orward} -Primer	10 pmol
R _{everse} -Primer	10 pmol
dNTPs	200 µM je dNTP
MgCl ₂	2 mM
10X RedTaq-Puffer	2 µL
RedTaq	1 U
ddH ₂ O	ad 20 µL

PCR-Programm:

Denaturierung	95°C	1 min
Primerannealing	60°C	1 min
Elongation	72°C	2 min
<i>2 Zyklen</i>		

Denaturierung	95°C	1 min
Primerannealing	58°C	1 min
Elongation	72°C	2 min
<i>33 Zyklen</i>		

Elongation	72°C	5 min
Kühlen	4°C	

2.11 RAPD-PCR mit mitochondrialer DNA

Um weitere Unterschiede in der mitochondrialen Genomorganisation zwischen den fertilen und männlich sterilen Linien „A2“ und „A102“, sowie „DH1“ und „D34-2“ und dem Plasmadonor *Brassica tournefortii* (Gouan) zu finden, wurde ein RAPD-Ansatz (Williams *et al.* 1990) gewählt. Zur Erhöhung der Polymorphie wurde ungeschnittene und mit Apol und DpnII geschnittene DNA aus den Southernexperimenten verwendet. Als Primer dienten OPM1 bis OPM6 (S. 86, 7.1) von Operon Technologies, Inc. Nach der PCR wurden der komplette Ansatz in einem 2%igen Agarosegel bei 3 V/cm aufgetrennt, polymorphe Banden ausgeschnitten und aufgereinigt. Es erfolgte eine

Digoxigeninmarkierung mittels PCR wie in 2.9.2 beschrieben.

PCR-Ansatz:

Verdaute Mitochondriale DNA	20 ng
Primer OPM1-6	1 pmol
dNTPs	100 µM je dNTP
MgCl ₂	3 mM
10X RedTaq-Puffer	2 µL
RedTaq	1,5 U
ddH ₂ O	ad 20 µL

RAPD-PCR Programm:

Denaturierung	95°C	1 min
Primerannealing	36°C	1 min
Elongation	72°C	2 min

45 Zyklen

Elongation	72°C	5 min
Kühlen	4°C	

Markierungsansatz :

Isolierte Bande 1:200	1 µL
Primer OPM ₁₋₆	10 pmol
Dig-11-dUTP/dNTPs	100 µM je dG/dA/dCTP; 82,5 µM dTTP; 17,5 µM Dig-11-dUTP
MgCl ₂	2 mM
10X RedTaq-Puffer	2,5 µL
RedTaq	1 U
ddH ₂ O	ad 25 µL

Markierungs-PCR Programm:

Denaturierung	95°C	1 min
Primerannealing	36°C	1 min
Elongation	72°C	1 min

30 Zyklen

Elongation	72°C	5 min
Kühlen	4°C	

2.12 ALB-Splinkerette-PCR

Die ligationsvermittelte PCR (LM-PCR) oder Anker-PCR ist eine gängige Methode zur Amplifikation von cDNAs, bei der PCR-Primer (Anker) entweder direkt oder nach der reversen Transkription an die mRNA bzw. cDNA ligiert werden. Die Anker dienen dann als Ausgangspunkt für die nachfolgende PCR. Dies hat den Vorteil, dass man auch unbekannte cDNAs amplifizieren kann, bzw. die 5'- und 3'-Enden erhält (RACE, Trott *et al.* 1992, Dumas Milne Edwards *et al.* 1991 und 1997, Maruyama *et al.* 1994).

Die „Approxy Ligation Based PCR“ beruht auf einem ähnlichen Prinzip. DNA wird mit Restriktionsenzymen geschnitten. An die Fragmente wird ein hakenförmiger doppelsträngiger Adapter (Splinkerette) (Devon *et al.* 1995) ligiert und anschliessend eine PCR mittels internem Adapterprimer und genspezifischem Primer durchgeführt (Guilfoyle *et al.* 1997, Padegimas *et al.* 1998).

Die Splinkerette-PCR wurde mit Abwandlungen, wie bei Devon *et al.* (1995) beschrieben, durchgeführt. Es wurden 3–5 µg mitochondriale DNA von „D34-2“ mit EcoRI, XmaI, BamHI und HindIII entsprechend Herstellerangaben 50fach verdaut und anschliessend hitzeinaktiviert, dann einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol 24/1 extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und in ddH₂O aufgenommen. Die Splinkeretten SPLNK-EcoRI, -XMAI, -HindIII, und -BamHI wurden wie beschrieben mit SPLNKTop hybridisiert. Circa 2 µg verdauter DNA wurden mit 0,4 µg Splinkerette und 3 Weiss-einheiten T4-DNA Ligase (MBI Fermentas) in 20 µL nach Protokoll über Nacht bei 15°C ligiert. Anschliessend wurde sie in einem „Microcon-YM 100“ der Firma Milipore nach Herstellerangaben zweimal mit ddH₂O gewaschen und auf eine Endkonzentration von ca. 50 ng/µL eingestellt. Es folgte ein 50 µL PCR-Ansatz mit der „proof reading Combizyme®“-DNA-Polymerase der Firma InViTek wie unten angegeben. Als PCR-Gerät diente ein „TGradient Block“ der Firma Biometra®. Alle PCR-Produkte wurden auf 1,5-3 %igen EtBr-Agarosegelen in 1X TAE-Puffer bei 3-5 V/cm aufgetrennt, ausgeschnitten, mittels „NucleoSpin® Extract 2 in 1“ von Macherey und Nagel gereinigt, die Konzentration wie beschrieben bestimmt und zum Direktsequenzieren mit den genspezifischen Primern oder dem SPLKI-Primer an die Firma GATC-Biotech AG geschickt.

Folgende Splinkeretteligationen zur Amplifikation der 5' und 3'-Regionen von *atp9* wurden gewählt:

- a) SPLNK-EcoRI
- b) -BamHI
- c) -HindIII
- d) -XmaI
- e) -BamI+HindIII (Doppelverdau)

Die verdaute mitochondriale DNA von „D34-2“ wurde mit a)-e); „DH1“ mit a)-d); „A102“, „A32“ und *Brassica tournefortii* (Gouan) mit a)-c) ligiert.

Für die nachfolgende Splinkerette-PCR wurde der Primer 0 (SPLK0) mit

I:RATP9;

II: FATP9;

III: R3'D34ATP9;

IV:R3'D34ATP9-2A;

V:R3'DH1ATP9 kombiniert.

Daraus ergaben sich folgende Ligations-Primerkombinationen:

-„D34-2“ a)-e) mit 0/I-V;

-„DH1“ a)-d) mit 0/I, II;

-„A102“ a)-c) mit 0/I-V;

-„A32“ und *Brassica tournefortii* (Gouan) a)-c) mit 0/I, II

Splinkerette-PCR Ansatz:

Ligierte Template DNA	100 ng
SPLK0-Primer	25 pmol
Genspezifischer Primer	25 pmol
10X Optiperform III-Puffer	5 µL
5X Optiperform Enhancer	10 µL
MgCL ₂	2,5 mM
Combizyme®-Polymerase	1 U
ddH ₂ O	ad 50 µL

ALB-Splinkerette-PCR

Block vorheizen auf 85°C

Denaturierung 95°C 45 sec
Einmal

Denaturierung 95°C 45 sec
Primerannealing 71°C 1 min
Elongation 72°C 4 min
Denaturierung 95°C 45 sec
Primerannealing 71°C 1 min
Elongation 72°C 4 min
7 Zyklen mit -2°C/Zyklus

Denaturierung 95°C 45 sec
Primerannealing 55°C 1 min
Elongation 72°C 4 min
20 Zyklen

Elongation 72°C 5 min
Kühlen 4°

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der atp6-Orf 263-Region einer möglichen CMS auslösenden Region der mtDNA

Die atp6-Orf 263-Region wird von Landgren *et al.* (1996) für die Ausprägung der männlichen Sterilität in der CMS *Tournefortii/Juncea* verantwortlich gemacht. Zur Charakterisierung dieser Region wurde eine PCR mit den Primern FORF263²/RORF263² sowohl in den männlich sterilen Linien „D34-2“ und „A102“, als auch in den fertilen Maintainern „DH1“ und „A2“ durchgeführt. In allen Fällen erhält man ein Amplifikat von 350 Basen Länge.

Mit den Primern FATP6/RORF263² wurde ebenfalls in allen Proben das erwartete Amplifikat von 866 Bp erhalten, allerdings war die Amplifikation in den Maintainern „DH1“ und „A2“ reproduzierbar schwächer als in den männlich sterilen Linien. Ausserdem trat in beiden Maintainern eine zweite schwächere Bande von 1021 Bp auf (Abb. 3.1.1).

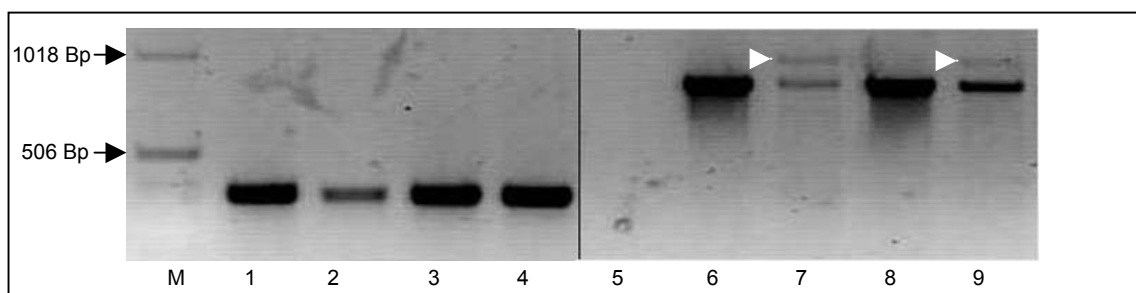


Abb. 3.1.1: PCR mit Primern FORF263²/RORF263² (1)-(5) und FATP6/RORF263² (6)-(9)
Das atp6-ncr-Amplifikat ist mit einem Pfeil markiert.
M.Marker, (1) „A102“ CMS *Juncea*, (2) „A2“ fertil, (3) „D34-2“ CMS *Tournefortii*
(4) „DH1“ fertil, (5) Negativkontrolle,
(6)-(9) wie (1)-(4) mit FATP6/RORF263² amplifiziert

Die Sequenzierung des 866 Bp Fragmentes (S. 89, 7.2, Nr. 28) ergab eine identische Sequenz zu Orf 263, wie bei Landgren *et al.*(1996) beschrieben. Somit ist Orf 263 auch in den untersuchten fertilen *Brassica napus*-Linien vorhanden. Es gelang darüber hinaus den Bereich atp6-Orf 263 mit diesen Primerkombinationen auch in den möglichen Restorern „Yudal“ und „Mangun“, *Brassica tournefortii* (Gouan) „A32“ CMS *Tokumasu* und *Brassica oleracea var. italica* (Brokkoli) „Emperor“ nachzuweisen.

Das 1021 Bp grosse PCR-Produkt (S. 88, 7.2, Nr. 25) stellte sich beim Homologievergleich mittels BLAST als weiteres 3'-Ende im Bereich des atp6-Gens heraus, das ebenfalls in allen von mir untersuchten *Brassicaceae* ausser in *Arabidopsis thaliana* zu amplifizieren ist. Dabei ergab sich beim Vergleich eine über 99%ige Sequenziden-

tität im Bereich des atp6-Gens, und zwar für die ersten 340 Basen zu *Brassica napus* (S. 93, Gbe.3), *Brassica napus*, „Regent“ CMS *Polima*, männlich steril (S. 93, Gbe.4), für 650 Basen *B. napus* „Polima“ (S. 93, Gbe.5) und *B. napus* „Isuzu-natane“ (S. 93, Gbe.6) und über 733 Basen zu *Raphanus sativus* männlich sterile Zelllinie CrGC15 Klon pTZ19R. (S. 93, Gbe.7; Abb. 3.1.2).

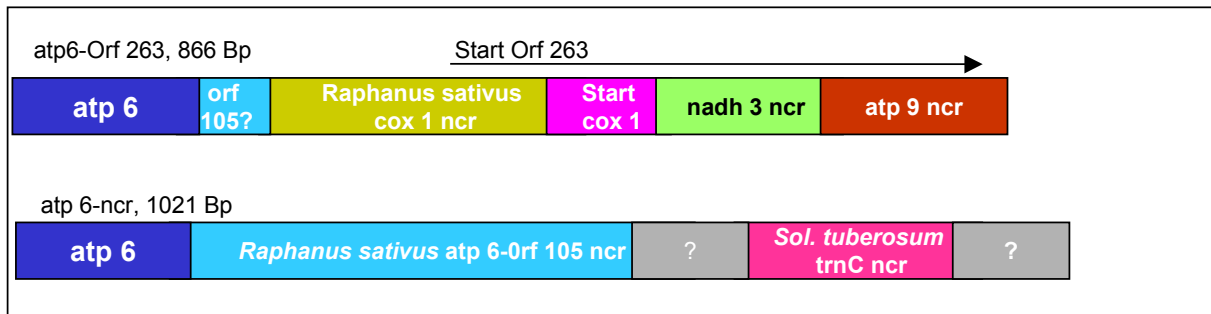


Abb. 3.1.2: Schematische Darstellung der beiden 3'-Bereiche von atp6 mit Homologien zu anderen mitochondrialen Sequenzen. ncr = nicht kodierende Region des entsprechenden Gens

Die Untersuchung mittels Southernblot und der Sonde atp6 (S. 82, 7.2, Nr.2) ergab in *Arabidopsis thaliana* wie erwartet in der Apol- (Abb.3.1.3), BsrBRI- und EcoRI-Restriktion zwei Hybridisierungssignale und ein Signal im DpnII- und BstXI-Ansatz. Der XmaI-Ansatz war in allen Blots nicht sicher auswertbar. Dagegen zeigten alle anderen Linien, trotz der PCR-amplifizierten zwei atp6-Gene, nur ein Hybridisierungssignal bei der atp6-Sonde.

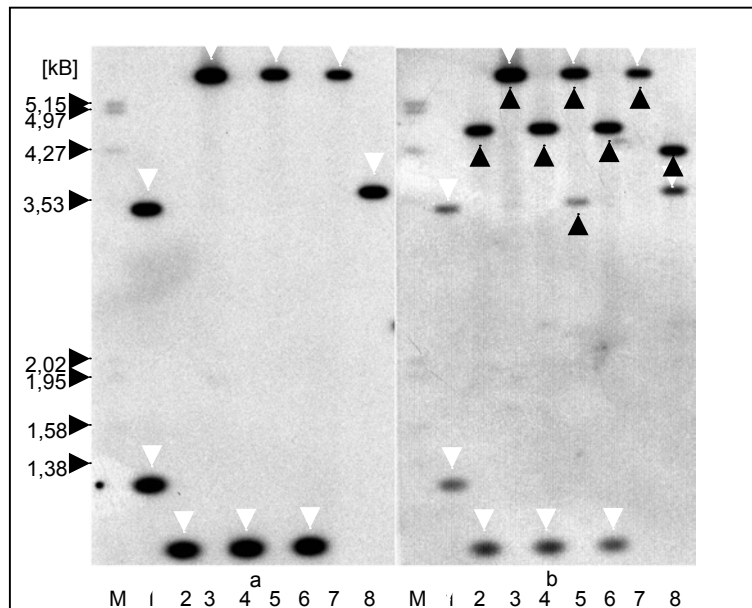


Abb. 3.1.3: Hybridisierung verschiedener *Brassicaceae* mit a) *atp6*-Sonde und b) *atp6-ncrA*-Sonde im Apol-Ansatz. Die weißen Pfeile markieren das *atp6*-Signal, die schwarzen das Hybridisierungssignal des *ncrA*-Bereichs der Sonde
M. Marker, (1) *A. thaliana* C24, (2) *B. tournefortii* (3) „DH1“ fertil, (4) „D34-2“ CMS *Tournefortii*, (5) „A2“ fertil, (6) „A102“ CMS *Juncea*, (7) *B. oleracea*, (8) „A32“ CMS *Tokumasu*

Tabelle 3.1.1: Hybridisierungsmuster mit der *atp6*-Sonde in fünf Restriktionsverdauen. Gleiche Fragmentgrößen sind „fett“, bzw. „kursiv“ hervorgehoben. Werte in [kB]

Verdau	<i>A. thaliana</i> C24	<i>B. tournefortii</i>	„DH1“ fertil	„D34-2“ steril	„A2“ fertil	„A102“ steril	<i>B. oleracea</i>	„A32“ steril
Dpn II	0,9	1,0	1,2	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0
Apol	3,5/1,3	1,0	6,8	1,0	6,8	1,0	6,8	3,8
EcoRI	4,3/1,6	6,1	8,6	4,3	8,6	6,1	8,6	7,5
BsrBRI	2,3	4,1	5,6	5,6	5,6	4,1	5,6	4,1
BstXI	5,7	12	5,6	10	5,6	12	5,6	1,3

Tabelle 3.1.2: Hybridisierungsmuster mit der *ncrA*-Sonde in fünf Restriktionsverdauen

Verdau	<i>A. thaliana</i> C24	<i>B. tournefortii</i>	„DH1“ fertil	„D34-2“ steril	„A2“ fertil	„A102“ steril	<i>B. oleracea</i>	„A32“ steril
Dpn II	-	1,0	0,71	1,0	0,71	1,0	0,71	1,0
Apol	-	4,6	6,8	4,7	6,8	4,7	6,8	3,7
EcoRI	-	4,6	8,6	4,6	8,6	4,6	8,6	4,6
BsrBRI	-	4,4	1,5	4,4	1,5	4,4	1,5	4,4
BstXI	-	8,6	5,6	8,6	5,6	8,6	5,6	7,4

Bei der *atp6*-Sonde und der *atp6-ncrA*-Sonde sind die Hybridisierungsmuster im Apol-, EcoRI- und BstXI-Verdau für die Maintainer „DH1“, „A2“ und *B. oleracea* identisch. Bei den CMS-Linien trifft dies jeweils für eine der Sonden zu, zwischen den Sonden finden sich aber immer Unterschiede. Das Gleiche gilt für die Maintainer im

BsrBRI-Ansatz, in dem es Unterschiede zwischen den Sonden gibt. Dies erklärt sich mit einer BsrBRI-Schnittstelle zwischen dem *atp6*-Gen und der *ncrA*-Region.

Bei der anschliessenden Northernblotanalyse mit der Sonde *atp6* (Abb. 3.1.4a) wurden in *Arabidopsis thaliana* zwei Transkripte mit einer Grösse von 880 und 1370 Basen und bei allen *Brassica*-Proben ein Hybridisierungssignal mit einer Grösse von ca. 950 Basen gefunden. Dies stimmt gut mit dem von Handa (1992) veröffentlichten Wert überein. Ausserdem trat bei der „A102“ CMS *Junceae* ein weiteres Signal mit einer Grösse von ca. 2,6 kB auf.

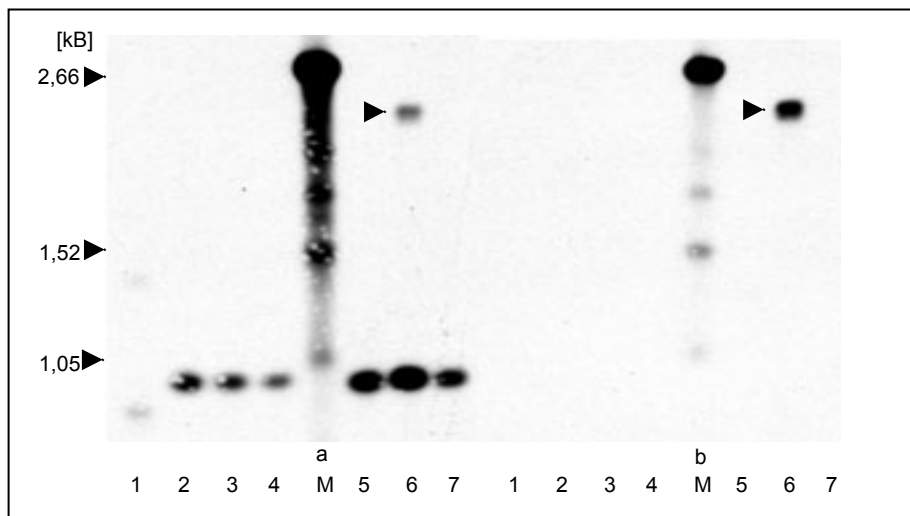


Abb. 3.1.4: Northernblot mit den Sonden a) *atp6* und b) *orf263*.
Das *atp6*-Orf263-Transkript ist mit einem Pfeil markiert.
Mitochondriale RNA von (1) *A. thaliana* C24, (2) *B. tournefortii*
(3) „DH1“ fertil, (4) „D34-2“ steril, (5) „A2“ fertil, (6) „A102“ steril,
(7) „A32“ steril, (M) Marker

Die Hybridisierung mit der Sonde *orf263* (Abb. 3.1.4b) zeigt nur in der Linie „A102“ ein Signal mit einer Grösse von ca. 2,6 kB, was dem von Landgren et al. (1996) beschriebenen *atp6*-Orf 263-Transkript entspricht. Dieses findet sich, unabhängig davon, ob mitochondriale RNA aus Knospen oder etiolierten Keimlingen verwendet wurde, nicht in „D34-2“ der CMS *Tournefortii* „Stiewe.

3.2 Suche nach CMS-spezifischen Polymorphismen mittels RAPD-PCR

Die RAPD-PCR wurde zunächst zur Probe mit den Linien „A2“ und „A102“ und den Markern M1-M5 durchgeführt. (Abb. 3.2.1).

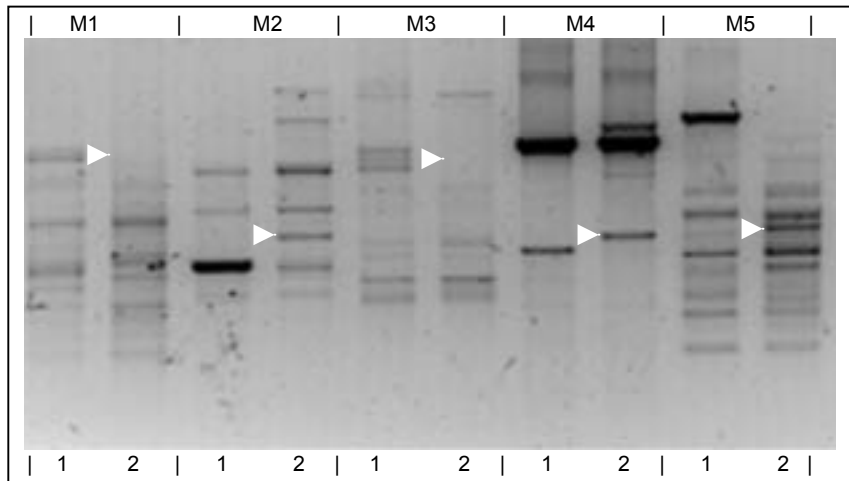


Abb. 3.2.1: RAPD-PCR mit den RAPD-Markern M1-M5 mit mitochondrialer DNA von (1) „A2“ und (2) „A102“ Exemplarische Unterschiede zwischen der fertilen und der sterilen Linie sind mit einem weissen Pfeil markiert.

Für weitere Tests wurden die Marker M5 und M6 ausgewählt und die PCR mit DpnII oder Apol restringierter, mitochondrialer DNA von *B. tournefortii* „D34-2“ und „DH1“ wiederholt. Die Restriktion vor der RAPD-PCR führte zu einer deutlichen Erhöhung der Bandenzahl (Abb. 3.2.2 b).

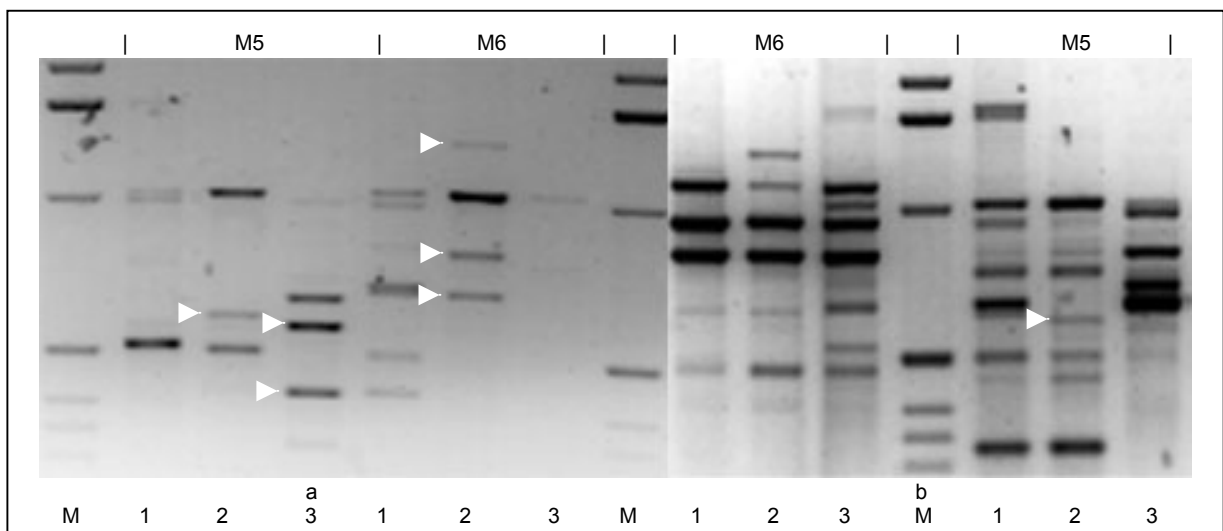


Abb. 3.2.2: RAPD-PCR mit Primern M5 und M6 mit a) unverdauter mitochondrialer DNA und b) Apol-Restriktion. Die markierten Banden wurden isoliert und als Sonden im Southernblot eingesetzt.

Polymorphe Marker, die nur in einer der drei Linien vorkamen, wurden für eine weitere Southernblotanalyse kloniert, mit Digoxigenin markiert und als Sonde im Southernblot verwendet.

Es zeigte sich allerdings, dass die so gewonnenen fünf Sonden zum Teil in allen drei Linien oder gar nicht hybridisierten (Abb. 3.2.3), so dass es unwahrscheinlich erschien, über diesen Ansatz relevante Unterschiede in der mitochondrialen Genomorganisation zwischen den Linien zu finden.

Deshalb wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt, sondern ein systematischer Ansatz mittels Reihenhybridisierung mit bekannten mitochondrialen Genen gewählt.

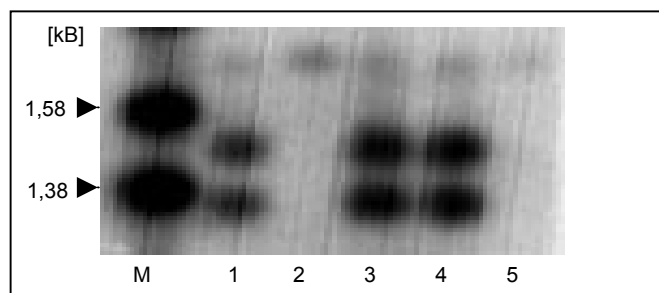


Abb. 3.2.3: Southernblot mit Sonde B1 (Abb. 3.2.2b) im Apol-Ansatz
(1) *B. tournefortii*, (2) „DH1“ (3) „D34-2“
(4) „A102“, (5) „A32“, (M) Marker

3.3 Suche nach CMS-spezifischen-Polymorphismen mittels Southernanalyse

Die Daten der Gesamtauswertung befinden sich im Anhang (S. 94ff. 7.4).

Die für die Southernanalyse ausgewählten Restriktionsenzyme zeigten über die gesamte Länge des mtGenoms von *Arabidopsis thaliana* eine gute Schnittverteilung. Der Unterschied in der Schnitthäufigkeit der einzelnen Restriktionsenzyme war gross. Das führte zu einer guten Verteilung der Fragmentgrössen, so dass die Enzyme für die Southernanalyse verwendet wurden (Abb. 3.3.0).

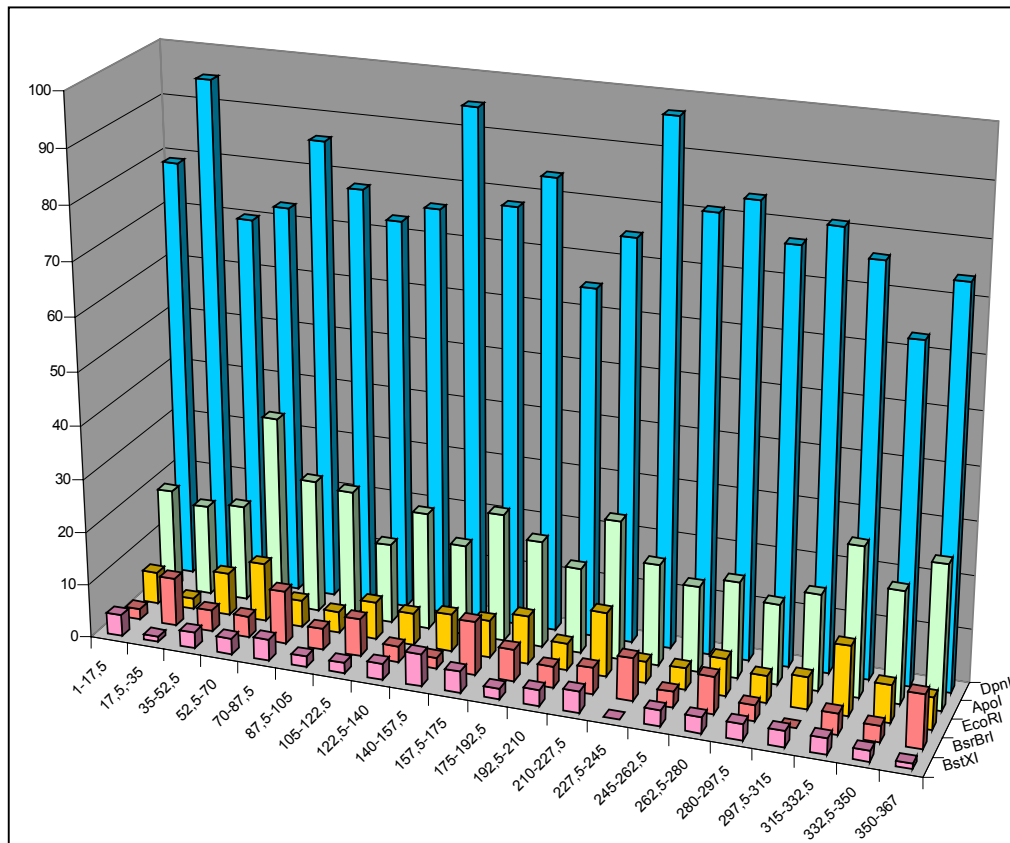


Abb. 3.3.0: Verteilung der Schnittstellen und Schnitthäufigkeit ausgewählter Restriktionsenzyme im mtGenom von *Arabidopsis thaliana*; x-Achse in kB, y-Achse Anzahl der Schnittstellen

Die bei der Southernanalyse gefundenen Unterschiede wurden folgendermassen unterteilt:

1. Unterschiede der sterilen Linie „D34-2“ CMS *Tournefortii* zu *Brassica tournefortii* und dem Maintainer „DH1“, also rekombinierte Regionen.
2. Unterschiede der sterilen Linie „D34-2“ CMS *Tournefortii* zur sterilen Linie „A102“ CMS *Juncea* und *Brassica tournefortii*.
3. Unterschiede zwischen den Maintainern „DH1“, „A2“ und *Brassica oleracea*.
4. Gemeinsamkeiten zwischen der sterilen Linie „A32“ CMS *Tokumasu* und den anderen CMS-Linien.

zu 1. Tabelle 3.3.1

Sonde	Verdau	„D34-2“ [kB]	<i>B. tournefortii</i> [kB]	„DH1“ [kB]
atp1	BsrBRI	22	17	17
atp1*	HindIII	5,6/4,5	4,9	5,6
atp1*	BamHI	13,8	3,9	3,5
atp6	EcoRI	4,3	6,1	8,6
atp6	BstXI	10	12	5,6
atp6*	BamHI	25,2	20,2	5,5
nad1	ApoI	(12)	(12/2,9)	(11)
nad2	EcoRI	7,1/3,8	9,9/7,7/3,8/1,4	4,0/3,2/1,3/1,2
nad3*	BamHI	7,6/(4,2)	19,2/(12,3)/4,2	(15,4)/4,2/1,8
nad4L	EcoRI	2,7/0,89/0,68	2,7/0,89	(14)/0,89/0,68
nad4L	BstXI	9	12	11
nad6	BsrBRI	20/(15)	(20)/15	17
orf263	EcoRI	4,3/2,6	6,1/2,6	3,4/2,6
orf263	BstXI	20/14	12	(20)/17

Die Zahlen in Klammern bezeichnen schwache Banden

*aus der Promotion von Stiewe (1993) übernommen

14 von 129 Sonden-Restriktionskombinationen zeigten rekombinierte Hybridisierungsmuster, das sind ca. 11% für die CMS *Tournefortii* "Stiewe".

zu 2. Tabelle 3.3.2

Sonde	Verdau	„D34-2“ [kB]	„A102“ [kB]	<i>B. tournefortii</i> [kB]
atp1	EcoRI	4,8	9,6	9,6
atp1	BsrBRI	22	19	17
atp1	BstXI	10	12	16
atp1*	HindIII	5,6/4,5	4,9	4,9
atp1*	BamHI	3,5	3,9	3,9
atp6	DpnII	1,2	1,0	1,0
atp6	EcoRI	4,3	6,1	6,1
atp6	BsrBRI	5,6	4,1	4,1
atp6	BstXI	10	12	12
atp6*	HindIII	3,1	1,9	1,9
atp6*	BamHI	4,2	5,4	5,4
atp9	EcoRI	8,2/(5,1/5,0)/3,8	(8,2)/5,1/5,0/(3,8)	8,2/(5,1/5,0)/3,8
atp9*	HindIII	6,5	6,3/1,5	6,5
atp9*	BamHI	6	5,6/1,6	6
cox1	EcoRI	14/(8,5/4,8)	14	18
cox1*	HindIII	(12,3)/8,1/(5,5)	12,3/8,1	12,3/8,1
cox3*	HindIII	4,5/4	4,0	4,0
nad1	ApoI	(12)/1,7	(11/4,4)/1,7	(12/2,9)/1,7
nad1	EcoRI	(16,7)/13/(3,1)	(16,7)/8,3	(16,7)/8,3
nad1	BsrBRI	10/(8)	8	8
nad1	BsttXI	19/2,4	19/2,4	19/2,4
nad2	DpnII	1,0/0,61/0,47/0,42	1,0/0,61/0,55/0,47/0,42	1,0/0,61/0,55/0,47/0,42
nad2	ApoI	1,0/0,89	1,4/1,0/0,89	1,4/1,0/0,89
nad2	EcoRI	7,1/3,8/0,95	9,9/4,9/3,8/1,4/0,95	9,9/7,7/3,8/1,4/0,95
nad2	BsrBRI	4,6/4,4/3,2	19/11/4,9/4,4/3,2	17/4,8/4,4/3,2
nad2	BstXI	19/12/11/4,6	19/17/12	19/8,0/7,0
nad3	BsrBRI	13	15	15
nad4L	EcoRI	2,7/0,89/0,68	2,7/0,89	2,7/0,89
nad6	ApoI	1,6/0,8	1,6/0,9	0,9
ccb382	BstXI	18	17	19
matR	BsrBRI	9,4	(19/13)/8,8	(19)/8,8

Sonde	Verdau	„D34-2“ [kB]	„A102“ [kB]	<i>B. tournefortii</i> [kB]
ncrB	Apol	4,7	4,7	4,6
orf263 ²	Apol	0,83/0,74	0,83/0,74	0,82/0,74
orf263 ²	EcoRI	4,3/2,6	6,1/2,6	6,1/2,6
orf263 ²	BsrBRI	13/2,5/0,56	16/5,9/0,56	15/5,9/0,56
orf263 ²	BstXI	(20)/14	20/14	12

Die Zahlen in Klammern bezeichnen schwache Banden.

*aus der Promotion von Stiewe (1993) übernommen

In 32 von 133 Sonden-Restriktionskombinationen zeigte die CMS *Tournefortii* "Stiewe" Unterschiede zum Plasmadonor *Brassica tournefortii*; das sind ca. 24%. Das Ergebnis im Vergleich zur CMS *Junceae* beträgt 31 von 133 und damit ca. 23%.

zu 3. Tabelle 3.3.3

Sonde	Verdau	„DH1“ [kB]	„A2“ [kB]	<i>B. oleracea</i> [kB]
atp9	Apol	(1,4)/1,1	1,4	1,6/(2,7)
atp9	EcoRI	2,6	2,9	12
atp9	BsrBRI	3,0	3,0	(9,0)
cox1	EcoRI	14/(7,3/4,3)	14/(8,5/5)	14
cox2	EcoRI	4,9/4,6/3,5/3,2	4,9	4,9
nad1	Apol	(11)/1,7	(11)/1,7	(11)/1,5
nad1	EcoRI	(16,7)/13/(3,1)	(16,7)/13/(3,1)	(16,7)/4,0
nad1	BsrBRI	10/(8)	10/(8)	3,1
nad1	BstXI	21/2,4	21/2,4	19/2,6
nad2	DpnII	1,0/0,42	1,0/0,55/0,42	1,0/0,55/0,42
nad2	Apol	1,2/1,1/1,0	1,1/1,0	1,1/1,0
nad2	EcoRI	4,1/3,2/1,3/1,2	9,5/4,0/3,2/1,4/0,95	4,0/1,1
nad2	BsrBRI	2,9/2,7	17/6,9/2,9/2,7	2,7
nad2	BstXI	22/20/17	21/17	21/2,9
nad3	BstXI	20	20	19
nad4L	EcoRI	14/0,89/0,68	2,7/0,89/0,68	14/0,89
nad4L	BsrBRI	15	(16)/7,2	(14)
nad4L	BstXI	11	15	11
nad6	Apol	1,6/0,9	4,4/1,6	4,4/1,6
ccb206	BsrBRI	4,8/3,2	4,9/3,2	4,9/3,2
ccb256	BsrBRI	(14)/11	(14)/11	-
ccb452	BsrBRI	19/18	19/18	-
matR	BsrBRI	9,4	(16/14)/9,4	3,3
matR	BstXI	16/(11)/2,4	15/(11)/2,4	(19/11)/2,4
ncrB	Apol	6,8	6,8/(3,6)	6,8
orf263 ²	Apol	0,9/0,74	1,0/0,7	0,9/0,68
orf263 ²	EcoRI	3,4/2,6	3,4/2,9	4,1/2,6
orf263 ²	BsrBRI	3,1/3,0	3,1/3,0	3,0
orf263 ²	BstXI	(20)/17	(20)/17	20/3,0

Der Unterschied von *Brassica napus* "Duplo" zu *Brassica napus* "Andor" umfasst 20 von 125 Sonden-Restriktionskombinationen und entspricht ca. 16%, der zu *Brassica oleracea* 27 von 125 Sonden-Restriktionsvergleichen; das entspricht ca. 22%

zu 4. Tabelle 3.3.4

Sonde	Verdau	„A32“ [kB]	„D34-2“	„A102“
atp9	DpnII	0,47	+	+
cox1	DpnII	0,53/0,38	+	+* ⁴
cox2	DpnII	0,78	+	+* ⁴
cox2	EcoRI	4,9	+	+
cox2	ApoI	2,7	+	+
cox2	BsrBRI	19	+	+
cox2	BstXI	3,5	+	+
cox3	DpnII	0,6	+	+* ³
nad1	DpnII	0,41	+	+
nad1	BsrBRI	8	(+)	(+) ¹
nad3	ApoI	0,6	+	+
nad3	BstXI	19	+	+* ²
nad4	ApoI	3,6	+	+* ³
nad4	EcoRI	8,2/1,2	+	+* ⁴
nad4	BsrBRI	3,3	+	+* ⁴
nad4	BstXI	9,7	+	+* ³
nad4L	DpnII	0,64	+	+* ⁴
nad5	DpnII	0,48	+	+* ³
nad5	BsrBRI	1,6	+	+* ⁴
nad5	BstXI	11	+	+* ⁴
nad6	DpnII	0,41	+	+* ³
nad6	EcoRI	(19)/11	+	+* ⁴
nad6	BstXI	18	+	+* ⁴
nad7	DpnII	0,73	+	+* ⁴
nad7	ApoI	3,6/1,6	+	+* ⁴
nad7	EcoRI	4,6/1,6	+	+* ⁴
nad7	BsrBRI	9,2	+	+* ⁴
nad7	BstXI	3,3	+	+* ⁴
nad9	DpnII	0,52/0,39	+	+* ³
nad9	ApoI	0,76	+	+* ³
nad9	EcoRI	14	+	+* ⁴
nad9	BsrBRI	4,7	+	+* ⁴
nad9	BstXI	12	+	+* ⁴
ccb203	DpnII	0,65	+	+* ³
ccb203	ApoI	1,1	+	+* ³
ccb203	EcoRI	2	+	+* ⁴
ccb203	BsrBRI	4,2	+	+* ⁴
ccb206	DpnII	1,5	+	+
ccb256	DpnII	0,52	+	+* ⁴
ccb256	ApoI	1,2	+	+* ⁴
ccb382	DpnII	0,42/0,37	+	+* ⁴
ccb382	ApoI	0,57	+	+* ³
ccb382	EcoRI	17	+	+* ⁴
ccb452	DpnII	0,6/0,39	+	+* ³
ccb452	ApoI	0,92	+	+* ⁴
ccb452	EcoRI	3,9	+	+* ⁴
ccb452	BsrBRI	19	+	+* ⁴
ccb452	BstXI	11	+	+* ⁴
matR	DpnII	(1,3)/0,81	+	+* ³
matR	ApoI	1,7	+	+* ⁴
matR	EcoRI	3,7/0,61	+	+* ⁴
matR	BsrBRI	8,8	-	+
cob	DpnII	0,93	+	+* ⁴
cob	ApoI	-	-	-* ⁴
cob	EcoRI	1,3	+	+* ⁴

Sonde	Verdau	„A32“ [kB]	„D34-2“	„A102“
cob	BsrBRI	20	+	+* ⁴
cob	BstXI	6,5	+	+* ⁴
orfX	DpnII	0,38	+	+* ³
orfX	ApoI	-	-	-* ³
orfX	EcoRI	3,7	+	+* ³
orfX	BsrBRI	1,6	+	+* ³
orfX	BstXI	2,4	+	+* ³
ncrB	EcoRI	4,6	+	+
ncrB	BsrBRI	4,4	+	+

*¹ als schwache Bande vorhanden

*² auch in *B. tournefortii* und *B. oleracea*

*³ in allen gleich

*⁴ in allen bis auf *A. thaliana* gleich

Die Auswertung der Daten zeigt eine Übereinstimmung der CMS *Tokumasu* mit der CMS *Tournefortii* "Stiewe" bzw. CMS *Juncea* von ca. 53% und 52%. Die Übereinstimmung, unter Einbeziehung der Gattung *Arabidopsis*, beträgt ca. 14% und innerhalb der Gattung *Brassica* 42%.

Unterschiede zu den Werten in Abb. 3.3.4-3.3.8 ergeben sich aus Rundungsungenauigkeiten. Ferner wurden in die Tabellen zum Teil die Werte von Stiewe (1993) in die Berechnung miteinbezogen.

Nur für die Orf x-Sonde findet sich ein gleiches Hybridisierungsmuster in allen Restriktionen bei allen Arten. Ferner findet sich bei allen *Brassicaceae*, ausser *Arabidopsis thaliana*, Übereinstimmung in allen Restriktionsansätzen für die Sonden nad4, nad7 und nad9 (siehe Tabelle 3.3.4). Stark polymorphe Bereiche mit vielen Hybridisierungssignalen lassen sich mit den Sonden atp9, nad1, nad2 und orf263² nachweisen.

Ein auffälliger Polymorphismus bezieht sich nicht auf die Fragmentgrösse oder -anzahl, sondern auf die Intensität des Hybridisierungssignals. So wurde mit der atp9-Sonde im EcoRI-Verdau ein Hybridisierungsmuster erhalten, bei dem *Brassica tournefortii*, CMS *Tournefortii* "Stiewe" und CMS *Juncea* zwar je vier Banden gleicher Grösse zeigen, aber die Intensitäten der Banden sind bei CMS *Tournefortii* "Stiewe" im Vergleich zur CMS *Juncea* umgekehrt (Abb. 3.3.1). Dies wurde mit mehreren Blots bestätigt und findet sich später auch in der unterschiedlichen Amplifikationsstärke für atp9-2 und atp9-2a im HindIII und BamHI-Verdau der ALB-Splinkerette-PCR wieder (S. 49, Abb. 3.6.1; S. 50, Abb. 3.6.2).

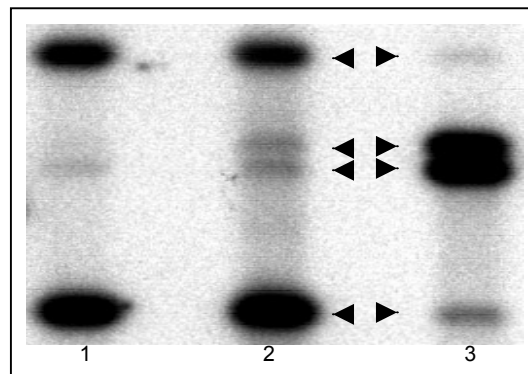


Abb. 3.3.1: Umgekehrte Signalstärke der atp9-Sonde im Southernblot mit mitochondrialer DNA
 (1) *Brassica tournefortii*,
 (2) CMS *Tournefortii* „Stiewe“
 (3) CMS *Juncea*

Eine weitergehende Analyse der RFLP-Daten in Bezug auf die Übereinstimmung der mitochondrialen Genomorganisation zwischen den untersuchten *Brassicaceae* und den CMS-Systemen wurde unternommen. Dabei wurden alle *Brassicaceae* auf ihre Übereinstimmung im RFLP-Muster untersucht und in Bezug zueinander gesetzt (Abb. 3.3.2 - Abb. 3.3.11). Es zeigte sich, dass *Arabidopsis thaliana* C24 Mitochondrien im Vergleich zu den anderen *Brassicaceae* in 125 Blots nur zu 16 bis 20% gleiche Hybridisierungsmuster aufweisen (Abb 3.3.2).

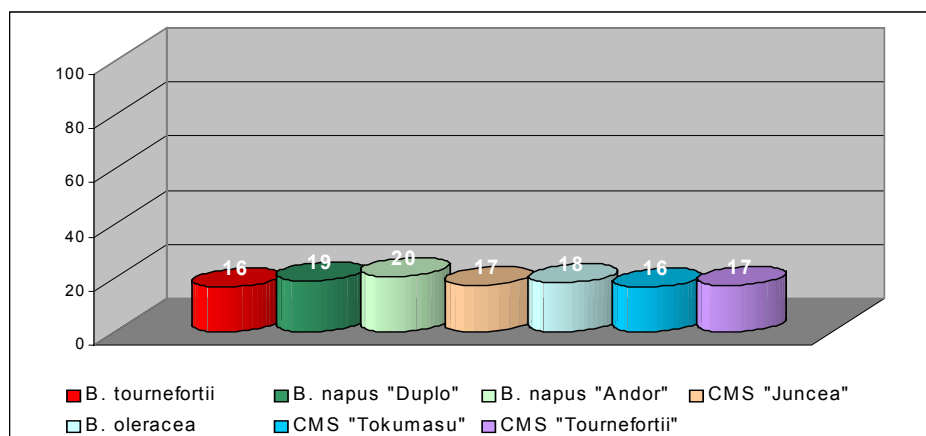


Abb. 3.3.2: Übereinstimmende Hybridisierungsmuster [%] zwischen *A. thaliana* C24 und sieben *Brassicaceae* bei Verwendung von 25 mitochondrialen Sonden und fünf Restriktionsenzymen

Dieser Wert reduziert sich auf acht bis elf Prozent, wenn man den DpnII-Ansatz nicht mit einbezieht. Als Restriktionsenzym mit einer Vierbasenerkennungssequenz schneidet DpnII entsprechend häufig innerhalb der kodierenden Regionen, also im Sondenbereich. Dort sind Polymorphismen aufgrund des Selektionsdruckes zum Codonerhalt der Sequenzen seltener als in nichtkodierenden Bereichen, die weiter entfernt von der Sonde liegen (Abb. 3.3.3).

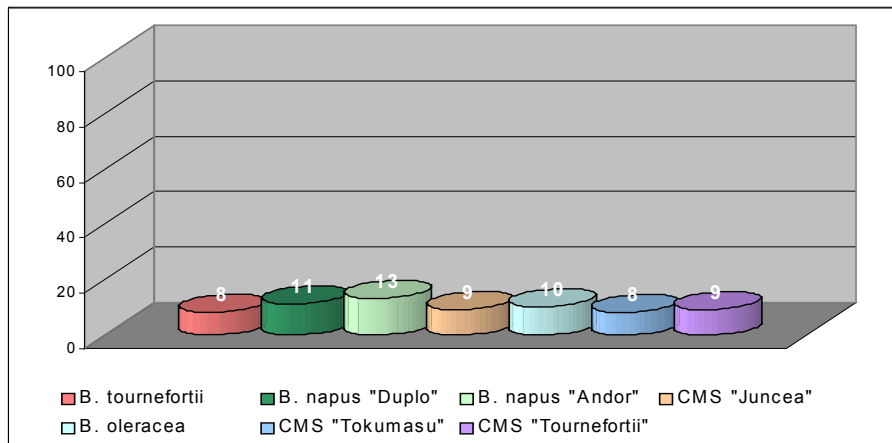


Abb. 3.3.3: Übereinstimmende Hybridisierungsmuster [%] zwischen *A. thaliana* C24 und sieben *Brassicaceae* bei Verwendung von 25 mitochondrialen Sonden und vier Restriktionsansätzen

Der Einfluss der Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms wird in Abb. 3.3.4 - 3.3.6 deutlich. Bei der Restriktion mit DpnII, einem Enzym das eine Vierbasenerkennungssequenz hat, stimmt *Arabidopsis thaliana* zu 50% mit der CMS *Tournefortii* "Stiewe" überein. Die anderen *Brassicaceae* kommen auf Werte von 79% (*Brassica napus* und *Brassica oleracea*) bis 96% (*Brassica tournefortii*) (Abb. 3.3.4).

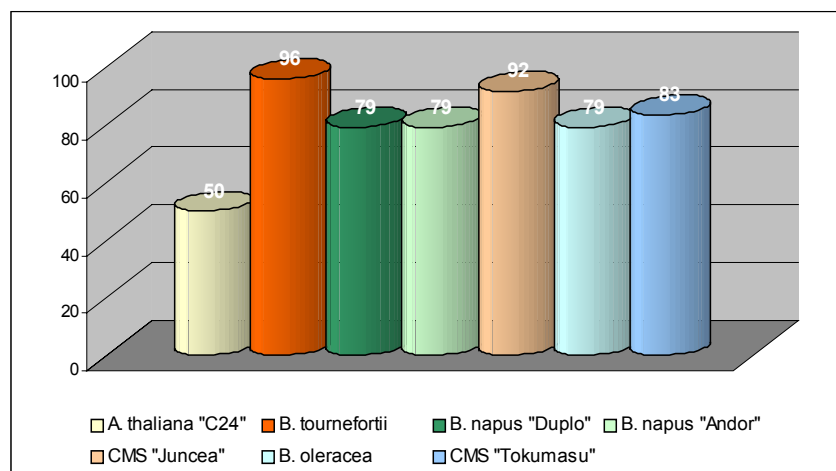


Abb. 3.3.4: Übereinstimmende Hybridisierungsmuster [%] zwischen CMS *Tournefortii* „Stiewe“ und sieben *Brassicaceae* bei Verwendung von 25 mitochondrialen Sonden im DpnII-Ansatz

Im EcoRI-Restriktionsansatz, bei dem das Enzym eine sechsbasige Erkennungssequenz hat, sinkt die Übereinstimmung für *Arabidopsis thaliana* auf vier Prozent und für die anderen Brassicaceae auf 48% (CMS *Tokumasu*) bis 68% (CMS *Juncea*) (Abb. 3.3.5).

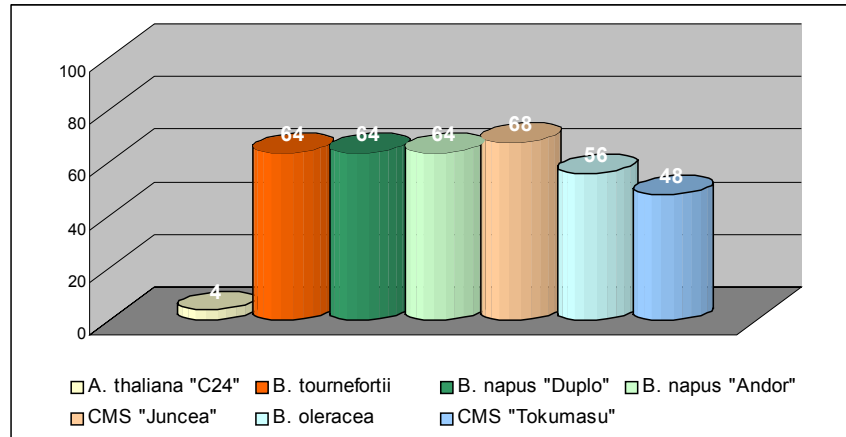


Abb. 3.3.5: Übereinstimmende Hybridisierungsmuster [%] zwischen CMS *Tournefortii* „Stiewe“ und sieben *Brassicaceae* bei Verwendung von 25 mitochondrialen Sonden im EcoRI-Ansatz

Eine noch deutlichere Unterscheidung der verschiedenen *Brassica napus*-Formen ist in der BstXI-Restriktion möglich. Hierbei handelt sich ebenfalls um eine sechsbasige Erkennungssequenz, die aber durch einen sechsbasigen Abstand beliebiger Zusammensetzung getrennt wird. Die Übereinstimmung der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ mit den übrigen *Brassica napus*-Arten beträgt nun 28% (CMS *Tokumasu*) bis 72% (CMS *Juncea*) (Abb. 3.3.6).

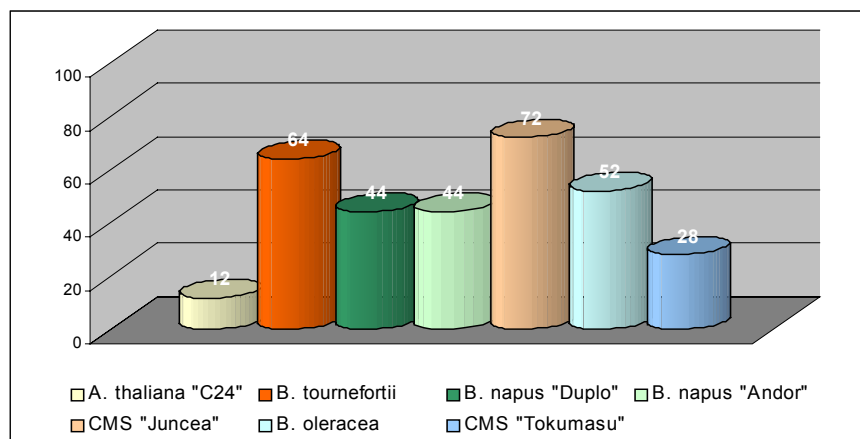


Abb. 3.3.6: Übereinstimmende Hybridisierungsmuster [%] zwischen CMS *Tournefortii* „Stiewe“ und sieben *Brassicaceae* bei Verwendung von 25 mitochondrialen Sonden im BstXI-Ansatz

Dennoch lässt sich bei allen Restriktionen eine grössere Ähnlichkeit der CMS *Tournefortii* "Stiewe" mit CMS *Juncea* als mit *Brassica tournefortii* erkennen.

Betrachtet man das CMS *Tournefortii* "Stiewe"-System in allen 125 Blots, so ergibt sich eine 77%ige Übereinstimmung zur CMS *Juncea*. Dies ist insofern interessant, als die CMS *Juncea* auf eine natürliche Kreuzung zwischen *Brassica juncea* und *Brassica tournefortii* zurückgeführt wird. Die Übereinstimmung mit den Protoplastenfusionseltern beträgt 74% für *Brassica tournefortii* und 58% für *Brassica napus* "Duplo". Insgesamt scheint die mitochondriale Organisation der CMS *Tournefortii* "Stiewe" eher der von *Brassica tournefortii* zu ähneln, was zu erwarten war, da es sich bei *Brassica tournefortii* um den Plasma- und damit Mitochondriendonator handelt (Abb. 3.3.7).

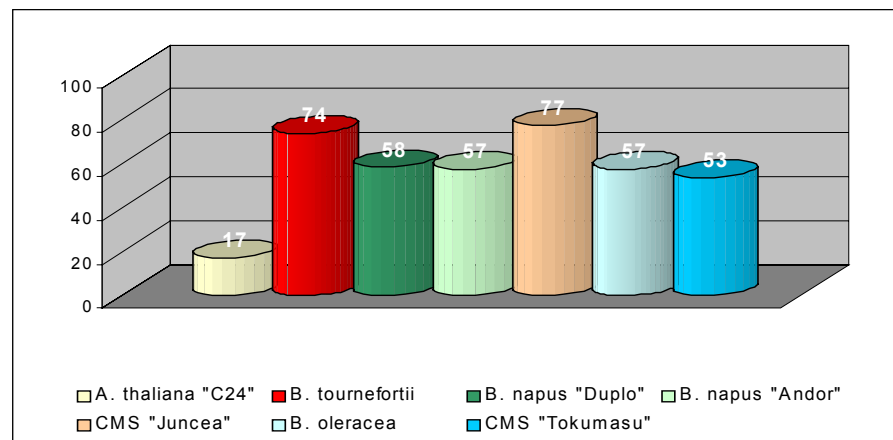


Abb. 3.3.7: Übereinstimmende Hybridisierungsmuster [%] zwischen CMS *Tournefortii* „Stiewe“ und sieben *Brassicaceae* bei Verwendung von 25 mitochondrialen Sonden und fünf Restriktionsansätzen

Für die CMS *Juncea* ergibt sich ein ähnliches Bild. Die Übereinstimmung mit *Brassica napus* "Duplo" und "Andor" liegt bei 51% und 50%, die Übereinstimmung mit *Brassica tournefortii* ist grösser als bei der CMS *Tournefortii* "Stiewe" (81%). Die Übereinstimmungen mit den anderen *Brassicaceae* entsprechen weitgehend den Werten der CMS *Tournefortii* "Stiewe". Zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse wäre ein Vergleich mit *Brassica juncea* sicher aufschlussreich (Abb. 3.3.8).

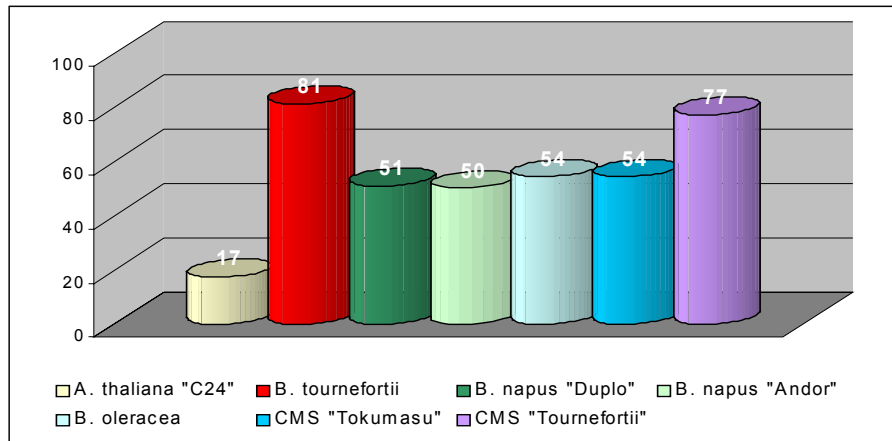


Abb. 3.3.8: Übereinstimmende Hybridisierungsmuster [%] zwischen CMS *Juncea* und sieben *Brassicaceae* bei Verwendung von 25 mitochondrialen Sonden und fünf Restriktionsansätzen

Das CMS *Tokumasu*-System unterscheidet sich deutlich von den anderen CMS-Systemen. Übereinstimmende Hybridisierungsmuster finden sich nur zu 46% (*Brassica napus* "Andor") bis 54% (CMS *Juncea*). Da es sich bei der CMS *Tokumasu* um ein in *Brassica napus* transferiertes *Raphanus*-Cytoplasma handelt, ist das zu erwarten. Auch hier wäre eine zusätzliche Analyse mit *Raphanus*-Mitochondrien aufschlussreich (Abb. 3.3.9).

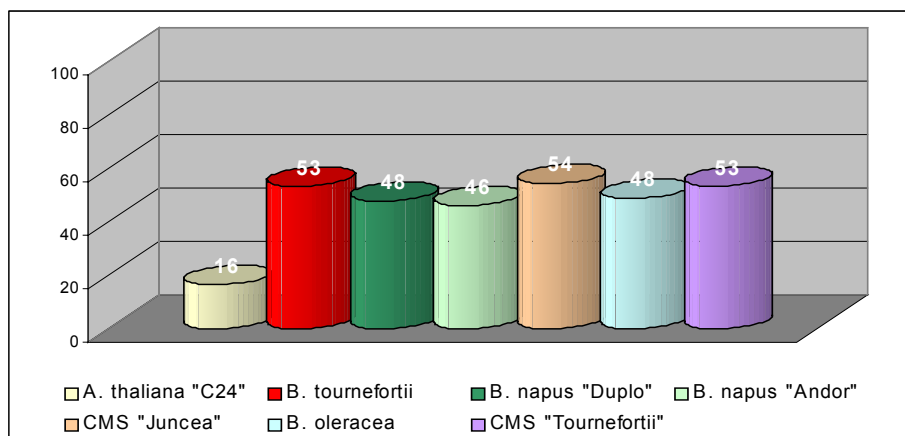


Abb. 3.3.9: Übereinstimmende Hybridisierungsmuster [%] zwischen CMS *Tokumasu* und sieben *Brassicaceae* bei Verwendung von 25 mitochondrialen Sonden und fünf Restriktionsansätzen

Im Vergleich verschiedener *Brassica napus*-Sorten zeigt die RFLP-Analyse bei *Brassica napus* "Duplo und " *Brassica napus* "Andor" nur eine Übereinstimmung von 82%, was dem Verhältnis der CMS *Juncea* zu *Brassica tournefortii* (81%) entspricht. Die Übereinstimmung zu *Brassica oleracea*, bei der es sich um einen der Elter von *Brassica napus* handelt, liegt bei 74% die Werte sinken bei der CMS *Tournefortii*

"Stiewe" auf 58% über 51% bei der CMS *Juncea* bis auf 49%, 48% bei *Brassica tournefortii* und der CMS *Tokumasu* (Abb. 3.3.10).

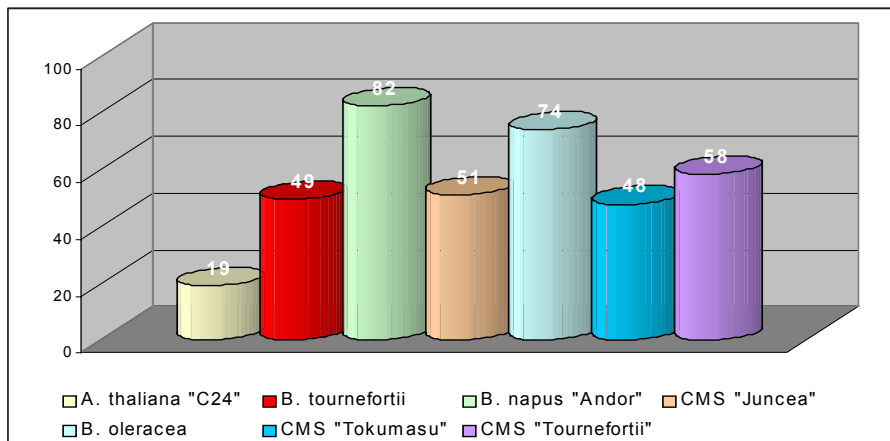


Abb. 3.3.10: Übereinstimmende Hybridisierungsmuster [%] zwischen *Brassica napus* „Duplo“ fertil und sieben *Brassicaceae* bei Verwendung von 25 mitochondrialen Sonden und fünf Restriktionsansätzen

3.4 mtGenomcharakterisierung mittels sondenüberspannender PCR

Von den verwendeten 30 Primerkombinationen zeigten 15 ein eindeutiges Ergebnis, die anderen amplifizierten entweder auch in *A. thaliana* nicht oder es wurden viele schwache Banden amplifiziert, die als unspezifisch verworfen wurden. Von den 15 Kombinationen, die als positiv bewertet wurden, zeigten sieben eine Übereinstimmung mit *Arabidopsis thaliana*.

Tabelle 3.4.1: Amplifikation von Exon-Exon Bereichen mittels Sondenprimer ausgehend von der mitochondrialen Genanordnung bei *A. thaliana*

Primerkombination	Erwartete Grösse ca. [kB]	<i>A. thaliana</i> C24	„DH1“	„D34-2“	„A2“	„A102“	„A32“
1) NAD5F-NAD9R	2,3	+	+	+	+	+	+
2) NAD9F- RPL16F	(1,3)	(+)	+* ¹	+* ¹	+* ¹	+* ¹	+* ¹
3) NAD9F-RPL16R	1,8	+	-	-	-	-	-
4) RPS3F-CCB206R	4,6	+	-	-	-	-	-
5) RPL5F-BNCOBR	2,6	+	+	+	+	+	+
6) RPS14F-COBR	2,1	+	+	+	+	+	+
7) NAD6F-RPS4R	6,0	+	-	-	-	-	-
8) NAD2F-NAD7R	4,9	+* ²	-	-	-	-	+* ^{2,3}
9) NAD1F-MATRR	2,7	+* ⁴	+* ⁴	+* ⁴	+* ⁴	+* ⁴	+* ⁴
10) RPL2F-ORF XR	3,1	+	+	+	+	+	+
11) ORF XF-NAD4R	6,5	+	+	+	+	+	+
12) BNCOBF-ORF BR* ⁵	1,0	+	-	-	-	-	-
13) CCB256F-NAD6R* ⁶	0,9	+	_* ⁷	_* ⁷	_* ⁷	_* ⁷	_* ⁷
14) CCB203F-NAD3F	3,9	+	-	-	-	-	-
15) BNNAD3F-RPS12R	0,7	+	+	+	+	+	+

Primerkombination	Erwartete Grösse ca. [kB]	<i>A. thaliana</i> C24	„DH1“	„D34-2“	„A2“	„A102“	„A32“
16) BNNAD3F- CCB206R* ⁸	1,2	-	+	+	+	(+)	-
17) NAD2F-ATP6R* ⁹	1,4	+	(+)	-	(+)	+	+* ¹⁰

*¹ bei inverser Orientierung im Vgl. zu *A. thaliana* starke Bande bei 0,9 kB

*² weitere schwache Bande bei 3,7 kB

*³ weitere starke Bande bei 2,3 und 1,3 kB

*⁴ weitere Bande bei ca. 0,8 kB

*⁵ Sowohl für den BNCOBF als auch für ORF BR findet sich bei *A. thaliana* neben der genspezifischen eine weitere Primerbindungsstelle bei denen die Primer ein Produkt von 0,97 kB erzeugen.

*⁶ 3' von ccb256 findet sich eine reverse Teilsequenz von nad6, die 36 Basen lang ist und den NAD6F-Primer einschliesst, so dass ein Produkt von 0,91 kB amplifiziert werden kann.

*⁷ „DH1“, „A2“ und „A32“ haben ein Produkt von ca. 1,5 kB, „D34-2“ und „A102“ ein Produkt von ca. 2,1 kB.

*⁸ für *Brassica napus* beschrieben (Itani *et al.* 1998)

*⁹ ein nad2-Fragment, bei dem der reverse Primer passt, wurde bei *A. thaliana* gefunden (Position 298040-298200) dieses sollte mit atp6-2 (Position 296825-297125) ein 1,38 kB Produkt ergeben.

*¹⁰ weiteres Produkt von ca. 2,1 kB

Den PCR-Ergebnissen entsprechende Hybridisierungsbanden wurden in den Southernblots gesucht.

Tabelle 3.4.2: Passende Hybridisierungsfragmente [kB] zu den Ergebnissen in Tabelle 3.4.1

Primerkombination	Restriktionsverdau				
	DpnII	ApoI	EcoRI	BsrBRI	BstXI
1) NAD5F-NAD9R	-	-	14* ¹	-	11* ^{2/3}
3) NAD9F-RPL16R	-* ⁴	-	-	-	-
5) RPL5F-BNCOBR	-* ⁴	-	-	-	-
6) RPS14F-COBR	-* ⁴	-	-	-	-
7) NAD6F-RPS4R	-* ⁴	-	-	-	-
9) NAD1F-MATRR	-* ⁴	-	-	-	-
10) RPL2F-ORF XR	-* ⁴	-	-	-	-
11) ORF XF-NAD4R	* ⁵	-	-	-	-
15) BNNAD3F-RPS12R	-* ⁴	-	-	-	-
16) BNNAD3F-CCB206R	-	-	2,6* ⁶	4,8* ⁷	19* ³

*¹ in *A. thaliana* 7,6/7,5 kB und in CMS *Tokumasu* 10/6,1 kB für nad5 und 14 kB für nad9

*² in *A. thaliana* 19 kB und in allen *Brassica* 11 kB für nad5 und 12 kB für nad9

*³ Aufgrund der Ungenauigkeit bei der Bestimmung grosser Fragmente wird der Wert als identisch angesehen.

*⁴ Southern nur mit einer der beiden Sonden durchgeführt

*⁵ alle Fragmente mit der orfx-Sonde sind kleiner als 4,6 kB

*⁶ +/- 100 Basen Differenz, keine Übereinstimmung in *A. thaliana* und CMS *Tokumasu*

*⁷ in *Brassica napus* "Duplo", "Andor" und *Brassica oleracea*

Trotz der vielen Sonden, die eingesetzt wurden, ist eine Bestimmung ihrer Reihenfolge im *Brassica*-Genom anhand der Southernblots nicht möglich. Von den neun Amplifikaten, die in *Brassica* nachweisbar sind, lassen sich lediglich zwei sicher einem Fragment der Southernblotanalyse zuordnen.

3.5 Untersuchung der mitochondrialen Transkription in fertilen und männlich sterilen Linien mittels Northernblotanalyse

Die Daten der Gesamtauswertung befinden sich im Anhang (S. 98ff. 7.5).

Es wurden 25 Sonden benutzt (S. 81ff. 7.2), von denen die Sonden BNnad3, ccb203 und ccb206 kein Signal ergaben. Die Verwendung aus Mitochondrien gewonnener RNA für die Northernblots führte, im Vergleich mit Gesamt-RNA, zu einer deutlichen Sensitivitätssteigerung, wobei die aus *B. tournefortii* gewonnene RNA von schlechter Qualität war und vielfach keine guten Hybridisierungen zeigte.

Folgende Unterschiede zwischen den fertilen und sterilen Linien wurden gefunden:

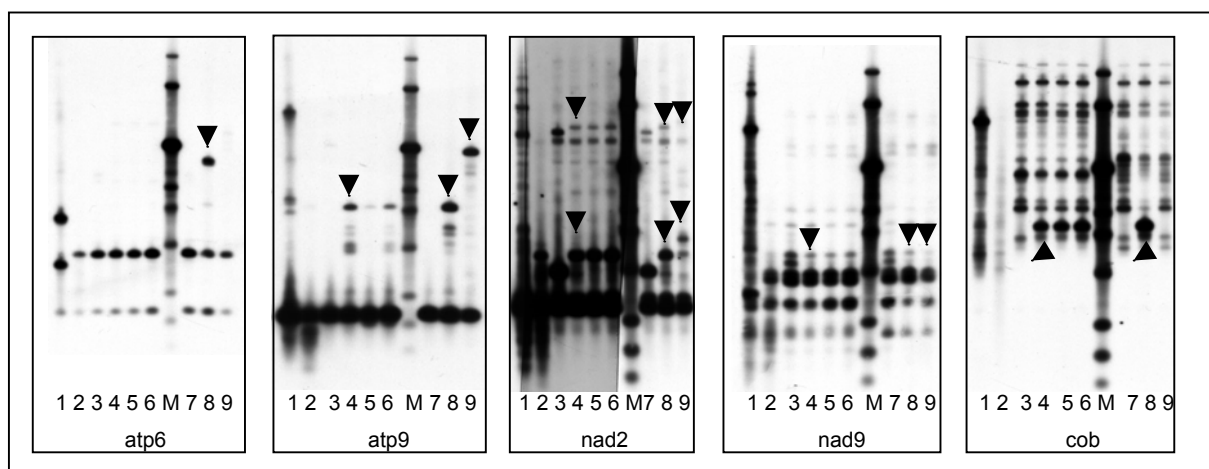


Abb. 3.5.1: Unterschiede zwischen sterilen und fertilen Linien in der Northernblotanalyse. Mitochondriale RNA von (1) *A. thaliana* C24, (2) *B. tournefortii*, (3) „DH1“ fertil, (4) „D34-2“ steril, (5) „D34-RF“ fertil, (6) „D34-RF“ steril, (7) „A2“ fertil, (8) „A102“ steril, (9) „A32“ steril, (M) Marker

Tabelle zu Abb. 3.5.1: Unterschiede in der Transkription

Sonde	„DH1“ [kB]	„D34-2“ [kB]	„D34-RF“ [kB]	„D34-RS“ [kB]	„A2“ [kB]	„A102“ [kB]	„A32“ [kB]
<u>atp6</u>	-	-	-	-	-	2,31	-
<u>orf263</u>	-	-	-	-	-	2,31	-
<u>atp9</u>	-	1,58	1,58	1,58	-	1,58	2,71
<u>nad2</u>	3,91/-	4,12/1,15/	4,12/1,15/	4,12/1,15/	3,91/-	4,12/1,15/	4,2/1,15
<u>nad9</u>	1,07	-	-	-	1,07	-	-
<u>cob</u>	-/-	-/1,53	-/1,53	-/1,53	3,06/-	3,06/1,53	3,06

Neben den Transkriptionsunterschieden zwischen den fertilen und sterilen Linien fanden sich auch Unterschiede zwischen den Sorten „Duplo“ und „Andor“, die auf den unterschiedlichen Kernhintergrund der beiden Sorten zurückzuführen sind, da sie unabhängig vom CMS-System auftreten (Abb. 3.5.2).

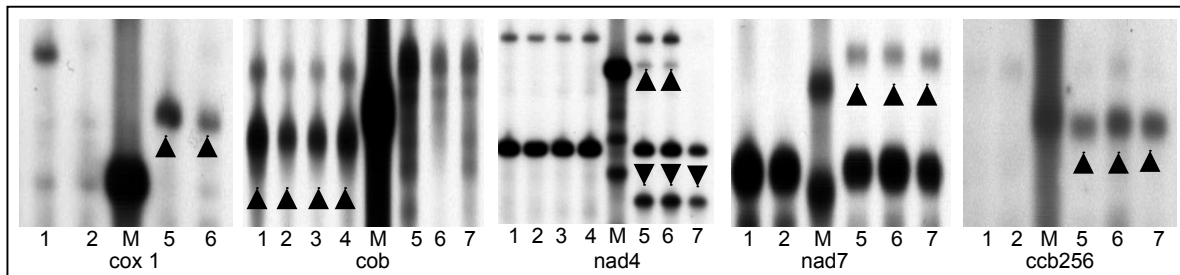


Abb. 3.5.2: Transkriptionsunterschiede zwischen den Rapssorten „Duplo“ und „Andor“ im Northernblot (1) „DH1“ fertil, (2) „D34-2“ steril, (3) „D34-RF“ fertil, (4) „D34-RS“ steril, (Alle in der Sorte „Duplo“) (5) „A2“ fertil, (6) „A102“ steril, (7) „A32“ steril, (M) Marker (Alle in der Sorte „Andor“)

Die Analyse der Northernergebnisse ergab vier Kandidaten, die aufgrund ihres veränderten Transkriptionsmusters zwischen den fertilen und sterilen Linien als Verursacher für die CMS in Frage kamen. Es waren *atp9*, *nad2*, *nad9* und *cob*.

Für den *cob*-Genbereich wird im 5'-Bereich ein Gencluster, bestehend aus den ribosomalen Proteinen S3, L16, L5 und S14, beschrieben (Ye *et al* 1993). Um zu prüfen, ob der Transkriptionsunterschied an einer Änderung im Bereich des Genclusters liegt, wurde eine weitere Northernanalyse mit den Sonden *rps3* und *rpl5* durchgeführt. Dabei zeigte sich aber für die beiden getesteten Sonden kein Unterschied zwischen fertilen und sterilen Linien (Abb. 3.5.3).

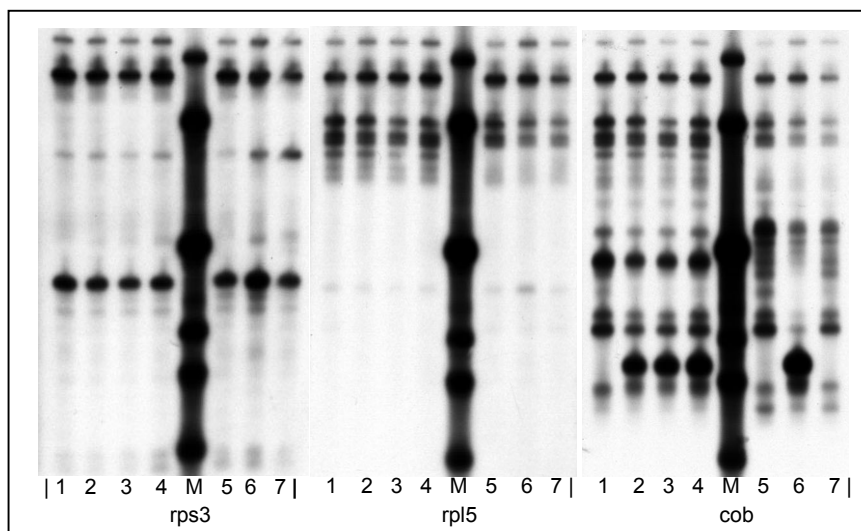


Abb. 3.5.3: Test auf Transkriptionsunterschiede im 5'-Bereich der polycistronischen Cytochrom b-mRNA (1) „DH1“ fertil, (2) „D34-2“ steril, (3) D34-RF“ fertil, (4) D34-RS“ steril, (5) „A2“ fertil, (6) „A102“ steril, (7) „A32“ steril, (M) Marker

Auch eine Analyse mittels ALB-Splinkerette-PCR brachte beim EcoRI-Ansatz sowohl für den 3'- als auch für den 5'-Bereich keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Da von den vier Kandidatengenomen nur *atp9* normalerweise eine monocistronische mRNA besitzt, diese Genregion im Southernblot Unterschiede zeigte und auch im CMS *Tournefortii*-System von Landgren *et al.* beschrieben wird, wurde der Genbereich 5' und 3' von *atp9* mittels ALB-Splinkerette-PCR näher charakterisiert.

3.6 Charakterisierung des mtGenombereich von *atp9* mittels ALB-Splinkerette-PCR

Die „Adapter Ligation Based Splinkerette PCR“ wurde mit EcoRI-, BamHI- und HindIII-Restriktionen und den entsprechenden Adapterligationen durchgeführt, da hier die Fragmentgrößen durch die Southernanalyse bekannt waren (S. 99ff., 7.4). Während „DH1“ im EcoRI-Ansatz sowohl für den F- als auch für den R-Primer die erwarteten Produkte von insgesamt 2,6 kB (2 kB für ATP9F und 0,6 kB für ATP9R) brachte, konnte in „D34-2“ nur mit dem R-Primer ein schwaches Produkt amplifiziert werden.

Die Amplifikation der mit HindIII restringierter und mit der HindIII-Splinkerette ligierten mitochondrialen DNA von „DH1“, „D34-2“, „A102“, „A32“ und *B. tournefortii* mit den Primern SPLK0 und RATP9 (für den 5'-Bereich) sowie SPLK0 und ATP9F (für den 3'-Bereich) zeigte für die erste Primerkombination in allen Proben ein Produkt von ca. 0,8 kB. Bei der CMS *Tokumasu* trat eine weitere Bande von ca. 1,1 kB auf.

Bei der zweiten Primerkombination zeigte „DH1“ keine Amplifikation. Bei den anderen Proben konnten je zwei Produkte von ca. 0,9 und 0,75 kB, bzw. bei A32 von ca. 1,4 und 0,75 kB amplifiziert werden. In *Brassica tournefortii* und „D34-2“ ist die 0,75 kB Bande stark ausgeprägt und bei „A102“ die 0,9 kB Bande (Abb. 3.6.1).

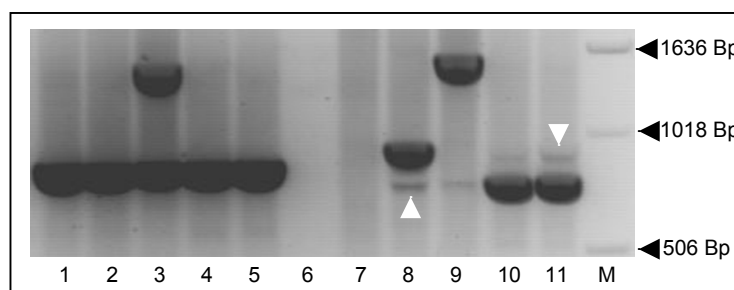


Abb. 3.6.1: Splinkerette-PCR mit HindIII verdauter Mitochondrien-DNA (1) „DH1“, (2) „A102“, (3) „A32“ (4) *B. tournefortii*, (5) „D34-2“, (6) Negativkontrolle, alle mit SPLK0/ATP9R, (M) Marker (7)-(11) wie (1)-(5), aber mit SPLK0/ATP9F amplifiziert

Im BamHI-Verdau zeigte sich mit dem ATP9F-Primer bei „D34-2“ und „A102“ ebenfalls je eine starke und eine schwache Bande allerdings waren die Intensitäten diesmal genau umgekehrt (Daten nicht gezeigt).

Die Sequenzierung der mit BamHI-Splinkerette erhaltenen Produkte aus „DH1“ ergab für den 3'-Bereich von *atp9* eine Konfiguration, die mit dem Genbankeintrag (S.93, Gbe.8) des NCBI für das *atp9*-Gen in *B. napus* „Isuzu-Natane“ (Handa 1993) zu 99% übereinstimmt. Auf eine Sequenzierung des 5'-Bereiches wurde daraufhin verzichtet. Die Sequenzierung der beiden Amplifikate in „D34-2“ und „A102“ ergab zwei verschiedene 3'-Bereiche des *atp9*-Gens. Die grössere Bande (*atp9-2*) ist zu 98 % identisch mit dem Genbankeintrag (S.93, Gbe.9) von Albaum *et. al* (1995). Die Sequenz wird als Pseudogen für *atp9* bei der CMS *Tokumasu* in *Brassica napus* beschrieben. Die kleinere Bande (*atp9-2a*) entspricht in den ersten 249 Basen nach dem *atp9*-Stop der Sequenz von *atp9-2*, dann folgen 111 von 182 Basen der 18S RNA Sequenz, die zu 99% identisch mit der von Giese *et al.* (1996) veröffentlichten Sequenz des 18S-rRNA-Gens in *A. thaliana* (S.93, Gbe.10) sind.

Eine Untersuchung dieser 3'-Sequenzen auf vorhandene offene Leseraster, mittels „ORF Finder“ des NCBI, die das 1,5 kB grosse Transkript im Northernblot erklären, war negativ.

Da zu den zwei 3'-Enden in der ALB-Splinkerette-PCR nur ein 5'-Ende gefunden werden konnte, wurden von den 3'-Enden Primer abgeleitet, die bis in den 5'-Bereich des *atp9*-Gens amplifizieren und damit die Zuordnung der 3'-Enden zu dem 5'-Ende, sowie den Erhalt des fehlenden 5'-Endes ermöglichen sollten (Abb. 3.6.2).

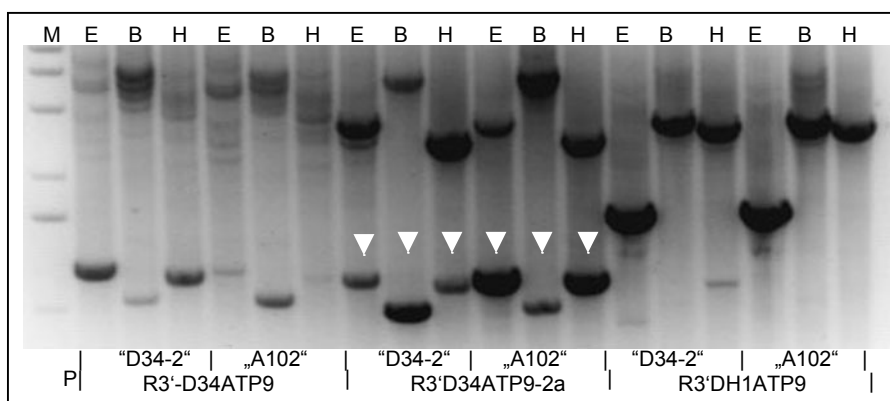


Abb. 3.6.2: Splinkerette-PCR mit verschiedenen Primern zur Amplifikation von 5'-Enden des *atp9*-Gens in „D34-2“ und „A102“
Die Pfeile markieren unterschiedliche Amplifikationsstärken zwischen „D34-2“ und „A102“ bei gleichem Primer.
(M) Marker, (P) Primer, (E) EcoRI-, (B) BamHI-, (H) HindIII-Restriktion

Bei den Primern R3'-D34ATP9 und R3'-D34ATP9-2a war die Amplifikationsstärke der Banden zwischen „D34-2“ und „A102“, wie schon bei Primer ATP9F im HindIII- und BamHI-Verdau beschrieben, umgekehrt (S. 49, Abb. 3.6.1; S. 50, Abb. 3.6.2).

Folgende PCR-Produkte wurden ansequenziert:

- „D34-2“/BamHI-Verdau/R3'D34ATP9-2a, beide Banden
- „D34-2“/BamHI-Verdau/R3'DH1ATP9, eine Bande
- „D34-2“/HindIII-Verdau/ATP9R, eine Bande und
- „D34-2“/EcoRI-Verdau/ R3'DH1ATP9, eine Bande.

zu a) Die obere Bande von „D34-2“/BamHI-Verdau/ R3'D34ATP9-2a erwies sich als identisch (94% Sequenzidentität) zum kodierenden Bereich der 18S-RNA des mitochondrialen Genoms von *A. thaliana* (S.93, Gbe.11).

Die untere Bande ergab Übereinstimmungen zum 5'-Bereich der von Albaum *et. al* (1995) als Pseudogen für *atp9* bei der CMS *Tokumasu* in *Brassica napus* beschriebenen Sequenz. Somit konnte diese Sequenz mit dem bereits erhaltenen 3'-Ende aus der BamHI-Splinkerette-PCR verbunden werden, da sie den fehlenden 5'-Bereich darstellt (Abb. 3.6.3).

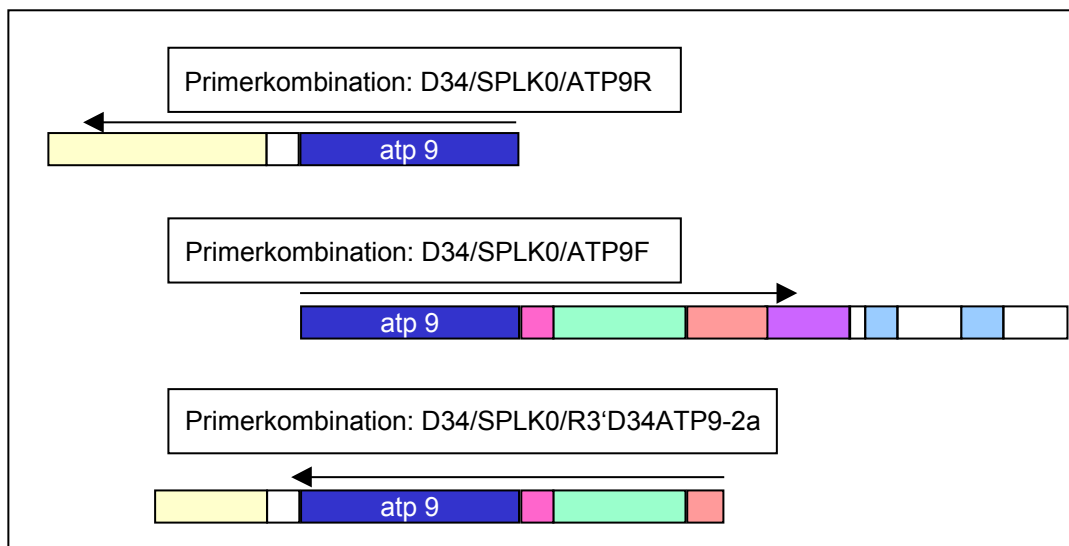


Abb. 3.6.3: Schematische Darstellung der Amplifikation des 3'- und 5'-Bereichs von *atp9* in „D34-2“ mittels ALB-Splinkerette-PCR. Die Pfeile geben die Amplifikationsrichtung an.

Im 3'-Bereich von *atp9-2a* befindet sich eine 43 Basen lange Sequenz (5'-TATAGAG TTTCGTTTCTTTTATCTATCTCCCCATTCGAACGAG-3'), die sich unmittelbar im Bereich des Starts des *atp1* von *Brassica rapa* (S.93, Gbe.24) und ca. 8 kB 3' des *atp6-1* in *Arabidopsis thaliana* (S.93, Gbe.25) befindet. Es könnte sich dabei um eine Repeat-Sequenz handeln.

Eine weitere ALB-Splinkerette-PCR mit dem Primer R5'D34SONDEATP9 im EcoRI-Verdau von CMS *Tournefortii* "Stiewe" ergab weitere 565 Basen des 5'-Endes von *atp9-2a*. Teile dieser Sequenz weisen hohe Identitäten zum mitochondrialen Genom von *A. thaliana* auf (S.93, Gbe.12 und 13). Die Anordnung ist jedoch nicht fortlaufend und es finden sich Sequenzüberschneidungen in beiden Teilen. Es wurde ein Sequenzmotiv gefunden (5'-[AGGTGCTTTAGCAACTCG]ACTGAAAAGGAGAGG-3'), das 13-mal komplett oder teilweise im mitochondrialen Genom von *Arabidopsis thaliana* vorkommt. Darüberhinaus kommt es in *Brassica napus* im Bereich des *rps3-rpl16-rpl5-rps14*-Genclusters (S.93, Gbe. 14), sowie in zwei Teilen im Bereich des Orf 263 der CMS *Tournefortii* "Landgren" (S.93, Gbe. 15) und im Bereich von *cox2* und dem *cox2*-Pseudogen bei *Brassica rapa* und *Raphanus sativus* (S.93, Gbe.16-20) vor.

zu b) Das ca. 2,8 kB Fragment „D34-2“/BamHI-Verdau/R3'DH1ATP9 hat eine 97%ige Übereinstimmung mit dem *matR*-Gen und zu 94-98% mit der 5'-Region von *nad1* Exon E (Basen 1608-2497, 3434-3832 und 3907-4391) in *A. thaliana* (S.93, Gbe.21) und stellt somit ebenfalls keinen *atp9*-Genbereich dar.

zu c) Das Amplifikat „D34-2“/HindIII-Verdau/ATP9R hat eine 99%ige Übereinstimmung mit dem 5' Bereich des *atp9*-Gens in *B. napus* „Isuzu-Natane“ (S.93, Gbe.8) von Handa (1993), und ebenfalls zu 98% zum nichtkodierenden 5'-Bereich des *nad3*-Gens in *Brassica napus* (S.93, Gbe.23). Eine Rekombination dieser Regionen ist wahrscheinlich, da beide Sequenzhomologien mit einer gleichen, invers zueinander liegenden, 75 Basen langen Sequenz beginnen (5'-AAGCTTGAAAGACTTAATAAAA CTCATCGGGATTCAAAGATCCCTTCCTTATTGATACAATTAGACCCGCCG CGG-3'). Eine weitere Übereinstimmung findet sich für diesen Bereich im Orf 263 in der 3'-Region des *atp6*-Gens in der von Landgren *et al.* (1996) beschriebenen CMS *Tournefortii*.

zu d) Das „D34-2“/EcoRI-Verdau/R3'DH1ATP9-Fragment ergab das gleiche Ergebnis wie „D34-2“/BamHI-Verdau/R3'DH1ATP9, woraus sich schliessen lässt, dass der Primer, obwohl abgeleitet aus dem 3'-Bereich des *atp9*-Gens von *Brassica napus*, im Bereich zwischen *matR* und *nad1* Exon 5 bindet.

Somit ergibt sich, dass es mindestens zwei *atp9*-Konfigurationen (*atp9-2* und

atp9-2a) in „D34-2“ CMS *Tournefortii* „Stiewe“ und „A102“ CMS *Juncea* gibt.

Die vergleichende Sequenzanalyse der veröffentlichten atp9-Konfigurationen mit den beiden der CMS *Tournefortii* "Stiewe" stellt sich als sehr komplex dar (Abb. 3.6.4). Es zeigt sich, dass sowohl die 3'- als auch die 5'-Bereiche eine Vielzahl an homologen Bereichen zu anderen mitochondrialen Genen aufweisen und somit vielfältige Rekombinationen stattgefunden haben. Dabei lässt sich das von Albaum (1995) veröffentlichte atp9 der *Raphanus*-CMS *Tokumasu* mit dem von Handa (1993) als gleich identifizieren.

Das atp9-Pseudogen von Albaum (1995) weist im 3'-Bereich eine ähnliche Organisation wie das atp9-2 und atp9-2a der CMS *Tournefortii* "Stiewe" auf. Auf drei gleiche Homologiebereiche folgt bei allen eine 23 Basen lange Sequenz (5'-CCTTCTGAGCCAGGATCAAAC-3'), die sich auch in anderen Pflanzen (u.a. *Solanum tuberosum*, *Pisum sativum*, *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana*) findet und Teil der 18S-RNA Sequenz ist. Tatsächlich folgen im atp9-2a auf diese Sequenz 111 Basen der 18S RNA aus *Arabidopsis thaliana*, danach kommen dann Bereiche mit Übereinstimmungen zum atp1-Gen in *Brassica rapa* bzw. bisher unveröffentlichten Sequenzbereichen.

Bei atp9-2 folgen 46 Basen, die identisch zum von Albaum (1995) beschriebenen atp9-Pseudogen sind, worauf sich dann aber abweichend dazu die 23 Basensequenz der 18S-RNA wiederholt. Es schliesst sich ein weiterer Bereich an, der homolog zum atp9-Pseudogen ist, danach folgt ein unbekannter Sequenzteil.

Bei dem atp9-Pseudogen gibt es lediglich den 23 Basenbereich, danach folgt keine Sequenzwiederholung und keine 18S RNA Sequenz. Die 5'-Bereiche unterscheiden sich ebenfalls voneinander. Der 5'-Bereich von atp9-2a konnte eindeutig mit einem der amplifizierten 3'-Bereiche mittels Splinkerette-PCR verbunden werden. Bei atp9-2 war dies nicht möglich, da ein weiter 3' gelegener Primer nur Sequenzen aus dem matR/nad1-Genbereich amplifizierte (s.o.).

Es bleibt ungeklärt, ob es weitere atp9-Genbereiche in der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ gibt oder ob es sich bei der erhaltenen Sequenz tatsächlich um den 5'-Bereich zu atp9-2 handelt. Dieser amplifizierte 5'-Bereich ist von seiner Organisation her identisch mit dem von Handa beschriebenen (1993). Bei atp9-2a und dem Atp9-Pseudogen der CMS *Tokumasu* findet sich in beiden ein unterschiedlich langer homologer Bereich zum nad5-Gen in *Brassica napus*, ansonsten sind die weiteren Bereiche in atp9-2a ohne Übereinstimmungen zu anderen bekannten Sequenzen.

3. Ergebnisse



Abb. 3.6.4: Schematische Darstellung der Genhomologien und möglichen Rekombinationsbereiche im Bereich des atp9-Gens im Vergleich zwischen verschiedenen CMS-Systemen in *Brassica napus*. Bereiche ohne Homologien zu bekannten Sequenzen sind weiss dargestellt.

Für die Klärung ob *atp9-2* oder *atp9-2a* für das ca. 1,5 kB Transkript im Northernblots verantwortlich ist, wurden Sonden für die 5'- und 3'-Bereiche hergestellt und mit mitochondrialer RNA aus Blütenknospen hybridisiert. Dabei gab nur die Sonde 5'*atp9-2a* in der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ und CMS *Juncea* ein Signal von ca. 1,5 kB. Bei der CMS *Tokumasu* tritt es nicht auf, was ein weiterer Beleg für die Verschiedenheit beider Gene im 5'-Bereich ist (Abb. 3.6.5).

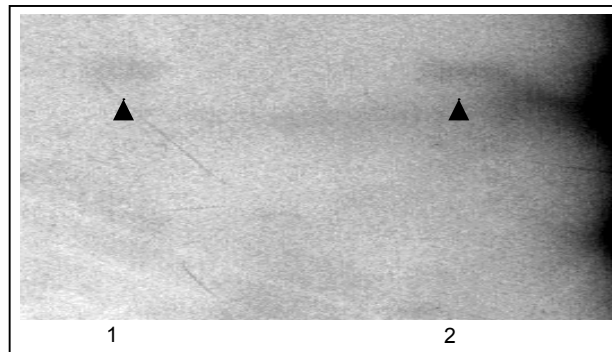


Abb. 3.6.5: Northernhybridisierung mit der Sonde 5'*atp9*. Das Signal findet sich in der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ (1) und CMS *Juncea* (2)

Die 1116 Basen des 5'-Bereichs und die sich anschliessende *atp9*-Sequenz wurden mit der "Translate"-Software von ExPASy im Internet auf offene Leseraster untersucht und in eine Proteinsequenz übersetzt. Es wurde ein durchgehendes offenes Leseraster von 193 Aminosäuren beginnend bei -587 bis zum Start von *atp9* und insgesamt von 267 Aminosäuren bis zum Stop von *atp9* identifiziert (S. 92, 7.2, Nr. 34).

Die Suche nach Ähnlichkeiten auf der Proteinebene ergab für den Bereich von Aminosäure 61 bis 173 eine Identität von 77% zum *atp6*-Protein in *Arabidopsis thaliana* (S.93, Gbe.25) und von 194 bis 267 eine Identität zum *atp9*-Protein in *Brassica napus* (S.93, Gbe.27). Ferner findet sich eine 50%ige Übereinstimmung von Aminosäure 11 bis 193 zum mitochondrialen Orf 276 in *Beta vulgaris* (S.93, Gbe.28).

Das errechnete Molekulargewicht beträgt 30,2 kDa /22,7 kDa und der theoretische *pI* liegt bei 5,29 /5,0 für das gesamte Protein /ohne *atp9*.

4. Diskussion

4.1 Vergleich der CMS-Systeme *Tournefortii* „Landgren“ und „Stiewe“

Das CMS-System von Landgren geht auf die Kreuzung von *Brassica napus* „Korall“ mit einer männlich sterilen alloplasmatischen *Brassica juncea*-Linie zurück (Landgren *et al.* 1996), die *Brassica juncea*-Linie wiederum auf die männlich sterile Linie von Rawat und Anand (1979). Letztere wird auch als CMS *Juncea* bezeichnet. Intensive Rückkreuzung mit *Brassica napus* „Korall“ ergaben die CMS *Tournefortii* „Landgren“.

Damit dürfte dieses System dem in dieser Arbeit verwendeten CMS *Juncea* System in *Brassica napus* „Andor“ entsprechen, das wahrscheinlich ebenfalls auf Rawat und Anand zurückzuführen ist.

Im Gegensatz dazu steht die CMS *Tournefortii* „Stiewe“. Sie wurde von Stiewe (1993) direkt durch asymmetrische Protoplastenfusion zwischen *Brassica napus* und *Brassica tournefortii* erzeugt. Schon morphologisch kann ein Unterschied anhand der Blütengestalt zwischen der CMS *Juncea* und der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ festgestellt werden. In der CMS *Juncea* treten immer wieder deformierte Blüten auf, bei denen die Antheren zu Fruchtknoten umgewandelt sind. Diese Erscheinung wird auch von Mathias (1985) bei der Einkreuzung der CMS *Juncea* in *Brassica napus* beschrieben. Bei der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ kommt es eher zu fadenförmig verkümmerten Antheren und Hochblättern und gekrümmten Fruchtknoten (Stiewe 1993).

Nach Auswertung der molekularen Unterschiede in den Southernhybridisierungen (S. 43, Abb. 3.3.7 und S. 44, Abb. 3.3.8) zeigt die CMS *Juncea* eine 77%ige Übereinstimmung mit der CMS *Tournefortii* „Stiewe“. Beide Systeme stehen *Brassica tournefortii* näher (81% bzw. 74%) als *Brassica napus* (51% bzw. 58%). Damit dürfte sich aus oben genannten Gründen auch die CMS *Tournefortii* „Landgren“ (d.h. CMS *Juncea*) von der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ in ähnlicher Weise unterscheiden.

Die Untersuchung des von Landgren für die CMS *Tournefortii* verantwortlich gemachten Orf 263 zeigt, dass er sowohl in sterilen und fertilen Linien und darüberhinaus auch in *Brassica oleracea* nachzuweisen ist (S. 29, Abb. 3.1.1). Möglicherweise kommt er in den fertilen Formen in substöchiometrischer Menge vor, in den sterilen ist er dagegen überwiegend mit dem *atp6*-Gen assoziiert. Die Unterschiede der Amplifikationsstärke in der PCR legen diesen Schluss nahe. Die Tatsache, dass ein Teilfragment aus Orf 263 in allen Linien in etwa gleich stark amplifiziert, kann durch ein mehrfaches Vorhandensein von Orf 263 oder Teilen davon in Assoziation mit anderen Genbereichen, erklärt werden. Diese

Bereiche würden in der PCR mitamplifiziert werden, während bei einer PCR, die das atp6-Gen und den Orf 263 umfasst, nur dieser Bereich amplifiziert wird.

Die zweite Bande, die sich bei einer PCR mit fertilen Linien ergibt, stellt eine alternative Konfiguration des 3'-Bereichs von atp6 dar (S. 30, Abb. 3.1.2). Auch diese lässt sich in allen Linien nachweisen. Es könnte sich also um mindestens zwei atp6-Konfigurationen handeln, die in unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnissen auftreten. Ein Indiz dafür findet sich im Apol-Southernblot mit den Sonden atp6 und ncrA. Mit der atp6-Sonde bekommt man in allen *Brassica*-Linien ein Hybridisierungssignal. In *A. thaliana* treten jedoch zwei auf, da im mtGenom von *A. thaliana* zwei atp6-Loci vorhanden sind (Marienfeld *et al.* 1996). Mit der atp6-ncrA-Sonde, die den 3'-Bereich des zweiten atp6-Gens einschliesst, bekommt man in den sterilen Linien und *Brassica tournefortii* ein zusätzliches Signal, was auf zwei verschiedene Konfigurationen hindeutet. In den fertilen Linien und in *B. oleracea* erhält man nur ein Signal, das demjenigen entspricht, das sich auch mit der atp6-Sonde ergibt.

Die Konfiguration atp6-Orf 263 liegt in den fertilen Linien also in so geringer Menge vor, dass sie im Southernblot nicht zu detektieren ist (S. 31, Abb. 3.1.3). Ein weiteres Indiz für substöchiometrisch bedingte Unterschiede findet sich im EcoRI-Southernblot bei der Verwendung der atp9-Sonde. Dort sind die Signalintensitäten zwischen beiden CMS-Typen, bei gleicher Fragmentgrösse, reziprok (S. 40, Abb. 3.3.1). Auch in der ALB-Splinkerette-PCR findet sich der Unterschied wieder (S. 49, Abb. 3.6.1).

Der wichtigste Unterschied besteht aber in der Northernanalyse. Die von Landgren beschriebene mRNA aus atp6 und Orf 263 von ca. 2,3 kB findet sich nur in der CMS *Juncea*-Linie, nicht aber in der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ (S. 32, Abb. 3.1.4). Erst nach sehr langer Exposition wird mit der Sonde atp6 ein schwaches Signal im Bereich des atp6-Orf 263-Transkripts sichtbar, das dann allerdings auch in den fertilen Linien auftritt. Damit ist der Orf 263 zumindest in der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ nicht für die männliche Sterilität verantwortlich und auch in der CMS *Tournefortii* „Landgren“ bzw. CMS *Juncea* steht der Nachweis, dass dieser Orf auch translatiert wird, noch aus.

4.2 Suche nach CMS-spezifischen Polymorphismen mittels RAPD-PCR

Ein schnelles Verfahren, um Unterschiede im mtGenom zwischen den fertilen und sterilen Linien zu finden, stellt die Verwendung von RAPDs (Williams *et al.* 1990) dar. Die Amplifikation in kleinen, wenig komplexen Genomen, wie dem mitochondrialen, lässt aufgrund der geringeren potentiellen Bindungsstellen des jeweiligen RAPD-Primers, eine verminder-

te Bandenzahl erwarten. Damit schränkt sich die Zahl der polymorphen Banden ebenfalls ein.

Ferner beeinflussen eine Vielzahl von Faktoren (Template, Primersequenz und -länge, Annealingtemperatur etc.) die RAPD-PCR und damit die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der Ergebnisse (Caetano-Anollés *et al.* 1992).

Die Verwendung von zwei verschiedenen RAPD-Primern führte, wie schon Debener *et al.* (1998) für RAPD-Analysen mit zwei RAPD-Primern in Rose beschrieben, erwartungsgemäss zu einer starken Reduzierung an Amplifikaten und wurde nicht weiter verfolgt.

Einige der gewählten RAPD-Primer zeigten in der PCR polymorphe Banden, die nur in den sterilen CMS-Linien vorkamen, nicht jedoch in den Fusionseltern *Brassica napus* und *Brassica tournefortii*. Auch der in dieser Arbeit gewählte Ansatz zur Erhöhung der polymorphen Banden mittels vorherigen Restriktionsverdau der mtDNA erwies sich als erfolgreich (S. 33, Abb. 3.2.2). Tatsächlich veränderte sich das RAPD-Profil dahingehend, dass mehr Banden amplifiziert wurden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass durch die Restriktion der DNA sehr lange RAPDs in der PCR nicht amplifiziert werden und somit mehr kurze RAPDs entstehen.

Auch die Wahl des Restriktionsenzym spielt eine Rolle. Während bei wenig schneidenden Enzymen wie BstXI praktisch kein Unterschied zu unverdauter DNA auftrat, wurde beim häufig schneidenden DpnII eine Abnahme der grossen Banden und der Anzahl insgesamt beobachtet (Daten nicht gezeigt). Als gut geeignet erwies sich Apol, das aufgrund seiner Erkennungssequenz RAATTY im Vergleich zu EcoRI viermal so oft schneidet.

Allerdings zeigte sich im Southernblot bei den mittels RAPD-PCR amplifizierten Banden, dass sie durchaus auch in den fertilen Linien hybridisierten, obwohl sie in der RAPD-PCR nur in den sterilen Linien amplifizierten (S. 34, Abb. 3.2.3). Auch wurden Ergebnisse im Southernblot erhalten, wonach statt einer einzelnen Bande mehrere schwache Banden vorkamen. Möglicherweise handelte es sich dabei um RAPDs, die repetitive Sequenzen oder Repeat-Sequenzen enthielten. Da die polymorphen RAPD-Banden direkt isoliert und markiert wurden, ist es auch denkbar, dass es sich um mehrere im Gel nicht zu unterscheidende ähnlich grosse Banden mit unterschiedlicher Sequenz handelte, die dann mit ihrer jeweiligen Zielsequenz hybridisierten.

Insgesamt ist die Verwendung von molekularen Markern wie RAPD, RFLP und auch AFLP sicher gut geeignet, um die mtGenome der verschiedenen Linien zu unterscheiden und Marker zur einfachen Bestimmung der Cytoplasmen zu entwickeln. Allerdings geben die polymorphen Banden, auch bei ihrer Sequenzierung, keinen direkten Nachweis, ob sie mit der CMS zusammenhängen. Um diese Frage abzuklären, wäre eine anschliessende

Nothernblotanalyse mit mtRNA nötig. Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen RFLP-Daten von bis zu 20% Unterschieden in den Mitochondrien der fertilen Linien „Duplo“ und „Andor“, ist mit vielen nichtsignifikanten Unterschieden zu rechnen.

Ein hoher Grad an Nukleotidsubstitutionen in mtDNA von Säugern wurde bereits von Brown *et al.* (1979) beschrieben. Im Vergleich dazu kommen Wolfe *et al.* (1987, 1989) in Pflanzen auf einen Wert, der bei ungefähr einem Zwölftel der nukleären Substitutionsrate liegt. Eine Untersuchung von Yang *et al.* (1999) über die Nukleotidsubstitution in mtDNA anhand des ersten Introns des *nad4*-Gens in zehn *Brassicaceae* zeigt eine durchschnittliche Substitutionsrate von 0,71% zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Brassica oleracea*. Hochgerechnet auf das ganze mtGenom aller sechs in der Publikation verwendeten *Brassicaceae* und *A. thaliana* ergibt sich ein Wert von 0,0066 pro Nukleotid, was bei der mtGenomgröße von *A. thaliana* ca. 2500 Substitutionen entspricht. Die Trennung der Gattung *Arabidopsis* von der Gattung *Brassica* wird damit auf 14,5 bis 20,4 Millionen Jahre geschätzt. Allerdings müssen diese Werte mit Vorsicht betrachtet werden, da nur ein Genort untersucht wurde und auch zwischen mitochondrialen Genen Unterschiede in der Substitutionsrate beobachtet wurden (Laroche *et al.* 1995).

Hieraus folgt, dass der Versuch, sich anhand der mtGenomorganisation von *A. thaliana* zu orientieren und Rückschlüsse auf *Brassica* abzuleiten, wenig erfolgversprechend ist. Zwar wurden in dieser Arbeit bei Vergleichen der SONDENSEQUENZEN von *Brassica napus* mit den Sequenzen von *A. thaliana* kaum Unterschiede gefunden, da es sich aber um kodierende Bereiche handelt, ist das wenig überraschend. In der RFLP-Analyse beträgt die Übereinstimmung der Hybridisierungsmuster zu den anderen *Brassicaceae* aber nur noch 8-11% (S. 41, Abb. 3.3.3). Dabei nimmt die Übereinstimmung um so mehr ab, je weiter man von der direkten SONDENUMGEBUNG zur Genanordnung kommt.

Dies zeigt sich bei der sondenüberspannenden PCR, bei der von 30 Sonden-Primer-Kombinationen, die in *Arabidopsis thaliana* amplifizieren sollten, nur fünfzehn amplifizierten und nur sieben davon in den *Brassica*-Linien ein positives Ergebnis lieferten. Nicht nur Nukleotidsubstitutionen sowie Deletionen, sondern Rekombinationen und Geninversionen, die dazu führen, dass die Primer in falscher Orientierung zueinander liegen, spielen hier eine Rolle. Ausserdem ist das mtGenom von *Brassica napus* bei gleicher Genanzahl, bezogen auf die Gene der Atmungskettenkomplexe und der ATP-Synthase (Annahme aufgrund der erhaltenen Northernergebnisse in dieser Arbeit), mit ca. 221 kB Grösse (Palmer *et al.* 1986) rund 145 kB kleiner als das von *A. thaliana*.

4.3 Charakterisierung der einzelnen mtGenome mittels RFLP-Analyse

Die RFLP-Analyse ist ebenso wie die RAPD-Analyse gut dazu geeignet, Unterschiede der mtGenomorganisation zwischen fertilen und sterilen Linien zu finden. Allerdings ist sie deutlich aufwändiger als die RAPD-Analyse.

Darüber hinaus müssen detektierte Unterschiede in keinem Zusammenhang zum untersuchten Genabschnitt stehen. Das heisst, ein Polymorphismus zwischen fertiler und steriler Linie, der beispielsweise mit der *atp6*-Sonde im BstXI-Verdau ein Hybridisierungssignal in der Grösse von 12 kB zeigt, sagt nichts über die Position des *atp6*-Gens auf diesem Fragment aus. Der Polymorphismus kann innerhalb des *atp6*-Gens liegen oder mehrere kB entfernt in den nichtkodierenden Bereichen. Die Lage des Gens lässt sich nur dann vermuten, wenn die Restriktionsfragmente klein genug sind und somit innerhalb des kodierenden Bereiches liegen, wie es bei den häufig schneidenden Restriktionsenzymen *ApoI* und *DpnII* der Fall ist.

Ein Vorteil gegenüber der RAPD-Analyse ist allerdings die Genspezifität der Probe. Da die in dieser Arbeit verwendeten Proben allesamt zwischen 150 und 300 Basen lang sind, sie nur innerhalb der kodierenden Bereiche der untersuchten mtGene liegen und ihre Sequenz bestimmt wurde, konnte bei einem Doppelsignal im Southernblot abgeleitet werden, ob dieses auf eine Schnittstelle innerhalb des von der Sonde erkannten Bereichs zurückzuführen ist oder ob es sich um eine tatsächliche Genduplikation handelt. Ob dann ein Pseudogen oder eine funktionelle Duplikation vorliegt, muss anschliessend geklärt werden. Auch ist es unter Umständen möglich, anhand der Signalstärke auf die relative Häufigkeit des Bereiches zu schliessen.

So erhält man mit der *atp9*-Sonde im *EcoRI*-Ansatz bei der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ ein Hybridisierungsmuster, bei dem die Bandenintensitäten genau umgekehrt sind (S. 40, Abb. 3.3.1). Ausserdem erhält man in allen anderen Restriktionsansätzen je zwei Signale, die auf das Vorhandensein von mindestens zwei *atp9*-Genen hindeuten, was sich in der ALB-Splinkerette-PCR bestätigte.

Ein einzelnes Hybridisierungssignal schliesst allerdings das Vorhandensein weiterer Genkonfigurationen nicht aus, da substöchiometrische Unterschiede unter Umständen im Southernblot nicht detektiert werden und nur in der PCR als Sublimes auftreten.

Die RFLP-Analyse zeigt darüber hinaus sehr gut den grossen Unterschied der mtGenomorganisation zwischen *Arabidopsis thaliana* und der Gattung *Brassica*. Die Übereinstimmung von lediglich 8% der Hybridisierungsmuster (S. 41, Abb. 3.3.3) über alle Sonden und Restriktionsansätze macht dies sehr deutlich. Nur der Bereich um Orf x stimmt in allen Restriktionen mit *Brassica* überein. Allerdings ist hier das grösste erhaltene Fragment aus

dem EcoRI-Verdau mit 3,7 kB nicht sehr gross. Bei allen anderen Sonden gibt es nur in einzelnen Restriktionsansätzen Übereinstimmungen. Die Überlegung, sich anhand der mitochondrialen Genomorganisation von *Arabidopsis thaliana* zu orientieren, erweist sich in anhand dieser Ergebnisse als nicht sinnvoll.

Einzelne mtGenomunterschiede zwischen *Brassica* und *A. thaliana* sind publiziert worden. So etwa die Konfiguration der Region nad3-rps12-ccb206 (Itani *et al.* 1998) in *Brassica*. Bei *Arabidopsis thaliana* dagegen liegen nad3-rps12 ca. 220 kB von ccb206 entfernt. Ausserdem wurde in *Brassica* in der Northernanalyse ein 4 kB langes Transkript gefunden, das auf eine Kotranskription der drei Gene hinweist. Als Ursache für diesen Unterschied in der mtGenomorganisation beschreibt Itani (1998) Rekombinationsbereiche, zwischen dem 3'-Bereich von rps12 und 5'-Bereich von ccb206 sowie im 3'-Bereich von ccb206. Diese Rekombinationsbereiche finden sich sowohl im mtGenom von *Arabidopsis thaliana* als auch im mtGenom von *Brassica*. Da in dieser Arbeit weder die Sonde ccb206, noch nad3 ein verwertbares Ergebnis im Northernblot lieferte, kann dazu keine Aussage getroffen werden.

Einen weiteren Unterschied beschreiben Ye *et al.* (1993). Der 5'-Bereich des Cytochrom b-Gens in *Brassica* weist ein Gencluster auf, das die ribosomalen Proteine S3, L16, L5 und S14 enthält. Bei *Arabidopsis thaliana* liegen rpl16 und rps3 hintereinander und sind ca. 30 kB vom Bereich rpl5-rpl14-cob getrennt. Dieses Gencluster konnte in dieser Arbeit im Northernblot mit den Sonden rps3, rpl5 und cob bestätigt werden. Alle drei Sonden beginnen mit einem gemeinsamen ca 7,6 kB Transkript, das dann prozessiert wird (S. 48, Abb. 3.5.3). Es ist allerdings zu beachten, dass fast alle veröffentlichten Daten zu *Brassica*-Sequenzen und deren mtGenomorganisation im Zusammenhang mit CMS-Untersuchungen stehen. In der Regel handelt es sich bei den untersuchten Pflanzen um sterile Linien, so dass die Daten nicht unbedingt die normale mtGenomorganisation wiedergeben. Darüber hinaus wurde zwischen den fertilen Rapslinien „DH1“ und „A2“ ein Unterschied von 20% bzw. 24% im Southernblot und Northernblot gefunden, was selbst innerhalb einer Art, zwischen unterschiedlichen Sorten, auf eine recht flexible mtGenomorganisation hinweist (S. 45, Abb. 3.3.10).

4.4 Charakterisierung der einzelnen *Brassica*-Linien mittels Transkriptanalyse

Die aussagekräftigste Methode zur CMS-Analyse stellt die systematische Northernblotanalyse dar. Hier stellt sich allerdings, wie bei allen Arbeiten mit direkt aus Pflanzen isolierten Mitochondrien, das Problem der Probengewinnung. Ideal wäre die Mitochondrienpräparation direkt aus dem Zielgewebe, also den Antheren, möglichst noch in dem Stadium,

bevor deren Degeneration beginnt. Dies ist bei einigen CMS-Systemen aber nicht möglich, da die Degeneration bereits bei der Differenzierung vom meristematischen Gewebe zur sporogenen Zelle stattfindet. Dies gilt z. B. für die CMS *Napus*, CMS *Polima* und auch CMS *Juncea* (Stiewe *et al.* 1995, Laser *et al.* 1972) (Abb. 4.4.1).

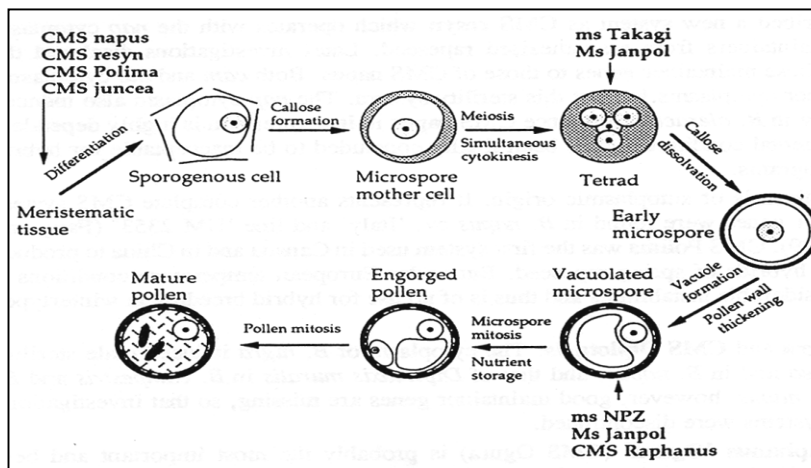


Abb. 4.4.1: Schema der Pollenentwicklung mit dargestellten Stadien des Degenerationsbeginns in verschiedenen CMS Systemen des Raps nach Stiewe *et al.* 1995

In einer Untersuchung zur Gametogenese in Raps stellten Fourgoux-Nicol *et al.* (1999) fest, dass bereits in Knospen von unter 2 mm Größe das Tetradenstadium erreicht wird. Somit müssten noch kleinere Knospen präpariert werden, was aufgrund der benötigten Menge zur Mitochondrienisolation unmöglich ist. Eine Arbeit mit zellulärer Gesamt-RNA ist auch möglich, jedoch hat es sich in dieser Arbeit gezeigt, dass die mitochondriale RNA-Analyse, gerade bei der Suche nach seltenen Transkripten, der Gesamt-RNA-Analyse an Sensitivität überlegen ist.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass nicht aus allen Geweben Mitochondrien in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden können. Hier stellt die von Mihr *et al.* (2001) entwickelte Erweiterung der Mitochondrienisolierung aus Knospen eine wesentliche Verbesserung dar, da mit den Blüten das Zielorgan, in dem sich die CMS ausprägt, untersucht wird. Eine Isolierung aus etiolierten Keimlingen ist zwar eine gängige Methode, aber die mtGenexpression im Keimling ist nicht mit der in der Blüte vergleichbar. So ist es möglich, dass das mit CMS assoziierte Gen nur in den Blüten oder Antheren exprimiert wird und damit in Keimlingen keine Transkripte auftreten.

Mitochondrien aus Zellgewebeskulturen befinden sich in einer unphysiologischen Situation und stellen kein gutes Ausgangsmaterial dar. Schirzadegan *et al.* (1991) fanden Instabilität von mitochondrialer DNA in Zellkulturen von *Brassica campestris*, die auf der Amplifikation verschiedener in den Pflanzen bereits existierender Pools von reorganisierten mtGenomen beruhte; nicht so sehr auf *de novo*-Entstehung durch Rekombination und Reorganisation.

Ferner ermöglicht die Isolierung von Mitochondrien aus Knospen einen direkten Test von spaltenden Restorerlinien, da man bis zur Blüte warten und die restaurierten von den nichtrestaurierten Pflanzen unterscheiden und analysieren kann. Bei der Arbeit mit etiolierten Keimlingen wäre das nicht möglich, da die Spaltung in restaurierte und nichtrestaurierte Pflanzen nicht zu erkennen ist.

Bei dem in dieser Arbeit gewählten Ansatz zur Northernblotanalyse lassen sich zwar nur Unterschiede in der Transkription bekannter Gene entdecken, andererseits werden die für die Sterilität verantwortlich gemachten offenen Leseraster oft mit anderen Genen kotranskribiert. Beispiele sind die 5'-Bereiche von *atp6* der CMS *Polima* und CMS *Napus* des Raps mit den Orfs 224 und -222 (Handa *et al.* 1992, L'Homme *et al.* 1997). Auch die in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen am von Landgren *et al.* (1996) beschriebenen Orf 263 im 3'-Bereich von *atp6* und die zum bisher unbekanntem Orf im 5'-Bereich von *atp9-2a* der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ sind mit mitochondrialen Genen assoziiert und werden kotranskribiert (S. 47, Abb. 3.5.1).

Breitere Analysemethoden wie auf AFLP basierende „mRNA fingerprint“ (Money *et al.* 1996) oder „Differential Display RT-PCR cDNA“-Analysen (Miele *et al.* 1999) sind unspezifischer und liefern oft falsch-positive Ergebnisse. Da mitochondriale mRNA nur zu einem sehr geringen Prozentsatz polyadenyliert vorliegt, und das vermutlich nur bei zum Abbau bestimmter mRNA (Gagliardi *et al.* 2001), ist sie nicht ohne weiteres von der ribosomalen RNA zu trennen, so dass diese in den Analysen mitamplifizieren und stören würde.

Ein Problem bei der Interpretation der erhaltenen Daten stellen zum einen die Gene dar, die durch mehrere Introns zerteilt werden oder polycistronisch sind, was sich in der Northernanalyse durch eine Vielzahl von Banden darstellt (*nad1*, *nad2*, *nad5*, *cob*). Weiterhin ist bei fast allen getesteten mtGenen von *Brassica* die exakte Transkriptlänge nicht bekannt, sondern muss aus den genomischen Sequenzen abgeschätzt werden. Über die zusätzliche Länge der zwar transkribierten aber untranslatierten Bereiche lässt sich somit keine genaue Aussage machen.

Ferner ist bei fast allen mtGenen des Raps nicht bekannt, ob sie kotranskribiert werden wie bei *nad3* (Itani *et al.* 1993) oder eine getrennte Transkription erfolgt. Eine Ableitung von *Arabidopsis* ist aufgrund der anderen mtGenomorganisation somit nur spekulativ. Ausserdem sind die aus Northernblots abgeleiteten Transkriptlängen verschiedener Publikationen nur schwer zu vergleichen, da die Werte immer einen gewissen Fehler beinhalten (vgl. hierzu die Werte für *nad2* dieser Arbeit mit denen von Handa *et al.* 1997). Darüber hinaus hat nicht nur die mitochondriale Organisation, wie in dieser Arbeit gezeigt, einen Einfluss auf die Transkription, sondern auch der Kernhintergrund. Unterschiede des

Kernhintergrunds sind die Ursache für das Vorkommen von verschiedenen Sorten bei einer Nutzpflanze -und so findet man zwischen verschiedenen Sorten auch Transkriptions- und Translationsunterschiede. Witt *et al.* (1997) zeigen dies auf Proteinebene für die mitochondriale Malatdehydrogenase in Raps und Haakansson *et al.* (1991) auf der Transkriptionsebene.

Bei den 21 auswertbaren Northernblots der vorliegenden Arbeit fanden sich bei fünf Genen (entspricht ca. 24%) Unterschiede im Expressionsprofil, die nicht auf einen Unterschied zwischen sterilen und fertilen Linien, sondern auf den Kernhintergrund zurückzuführen sind. Es handelt sich dabei auch nicht um mitochondrial bedingte Unterschiede, da sie sowohl in den sterilen als auch in den fertilen Typen einer Sorte, die unterschiedliche mitochondriale Genome repräsentieren, auftraten (S. 48, Abb. 3.5.2). Daraus ergibt sich, dass Expressionsprofile unterschiedlicher Rapsorten nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Ein Vergleich der sterilen Linie „A102“ mit der fertilen Linie „DH1“ hätte fälschlicherweise vier weitere mögliche CMS Kandidaten ergeben.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Transkriptionsunterschieden, die zwischen fertilen und sterilen Linien auftraten, finden sich zwei, die auf ein Kotranskript hindeuten (atp6 in CMS *Juncea* und atp9 in CMS *Tournefortii* „Stiewe“, CMS *Juncea* und CMS *Tokumasu*). Das atp6-Transkript scheidet jedoch als Ursache für die CMS aus (S. 47, Abb. 3.5.1). Bei atp9 handelt es sich bei der CMS *Tokumasu* um ein anderes Transkript als bei der CMS *Tournefortii* „Stiewe“. Es ist ca. 2,7 kB lang und unterscheidet sich in der Gensequenz (Albaum *et al.* 1995) im 5'- und im 3'-Bereich von dem Transkript der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ (S. 55, Abb. 3.6.5).

Bei nad2 tritt in allen sterilen Linien und in *Brassica tournefortii* ein zusätzliches Transkript von ca. 1,15 kB auf, wohingegen in den fertilen Linien ein ca 0,99 kB langes Transkript erscheint. Dieser Größenunterschied von ca. 200 Basen tritt auch bei ca. 4,12 kB bzw. 3,91 kB für die sterile bzw. fertile Linie auf. Die Tatsache, dass dieser Unterschied auch im fertilen Plasmadonor *Brassica tournefortii* auftritt, legt den Schluss nahe, dass es sich möglicherweise um Unterschiede der mRNA Prozessierung handelt, die nicht ursächlich mit der CMS zusammenhängen.

Bei nad9 verhält es sich ähnlich. Hier tritt in den fertilen Linien eine Bande von ca. 1,07 kB auf, die nicht in den sterilen zu finden ist.

Beim Gen für Apocytochrom b (cob) ist es etwas anders, da das transkribierte Gencluster im 3'-Bereich bereits charakterisiert wurde (Ye *et al.* 1993). Die zusätzliche Bande von ca. 1,53 kB in den sterilen Linien liegt nicht an der Prozessierung der mRNA im Bereich von rps3 oder rpl5, denn die Analyse mit diesen Sonden brachte in allen Linien das gleiche

Hybridisierungsmuster (S. 48, Abb. 3.5.3). Als Ursache käme ein Unterschied in der Prozessierung von rps14-cob oder eine Kotranskription im 3'-Bereich der cob in Frage. Allerdings konnten in einer ersten Analyse des 3'-Bereichs mittels ALB-Splinkerette-PCR keine Unterschiede detektiert werden. Eine eingehendere Analyse wäre zur Aufklärung nötig.

4.5 ALB-Splinkerette-PCR

Die Methode des „PCR walking“ (Arnold *et al.* 1991), mittels ALB-Splinkerette-PCR, zur Bestimmung flankierender Bereiche einer bekannten Sequenz hat den grossen Vorteil, dass aufwändige Schritte wie das Klonieren und Durchmustern von genomischen Banken nach dem Zielgen gespart werden können. Liegt das Gen in mehreren Konfigurationen vor, so lassen sich diese alle erhalten, indem man genügend Restriktionsverdau-Adapterkombinationen wählt. Zwar ist die Reichweite der PCR nicht unbegrenzt, so dass sehr lange Fragmente möglicherweise nicht amplifizieren, aber auch dies lässt sich durch Kombination mit verschiedenen Restriktionsenzymen umgehen. Mit dieser Methode gelang es, jeweils zwei verschiedene 3'- und 5'-Bereiche von *atp9* zu identifizieren. Bei einem Bereich (*atp9-2a*) gelang es ferner, das 5'- und 3'-Ende mittels das *atp9*-Gen überspannender ALB-Splinkerette-PCR zu verbinden. *Atp9-2a* erwies sich bei weiterer Analyse als vielversprechende mögliche Ursache der CMS in den Systemen *Tournefortii* „Stiewe“ und *Juncea*.

4.6 Analyse des *atp9*-Genorts der CMS *Tournefortii* „Stiewe“

Landgren *et al.* (1996) beschreibt in der Northernanalyse für die *atp9*-Sonde in ihrer CMS *Tournefortii* (*Juncea*)-Linie ein zusätzliches, ca. 1,8 kB grosses Fragment. Dieses sei innerhalb der restaurierten Linie nur in einigen fertilen, nicht aber in den männlich sterilen Segreganten aufgetreten. In der von ihr erzeugten CMS *Tournefortii*-Linie in *Brassica napus* sei es dagegen nicht nachzuweisen gewesen. Dies steht im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen. Das in dieser Arbeit mit ca. 1,6 kB bestimmte Transkript findet sich sowohl in der CMS *Juncea*-Linie, als auch in der CMS *Tournefortii* „Stiewe“. In den Restorern ist es in den fertilen und in den sterilen Segreganten zu finden. Das Transkript scheint in den fertilen Segreganten vermindert zu sein und kommt in den fertilen Linien „DH1“ und „A2“ gar nicht vor (S. 47, Abb. 3.5.1)

Die ALB-Splinkerette-PCR ergab für die hier untersuchte CMS *Tournefortii* „Stiewe“ und CMS *Juncea* mindestens zwei Gene für *atp9*, die in beiden CMS-Linien in reziproker Menge vorzukommen scheinen (S. 40, Abb. 3.3.1; S. 49, Abb. 3.6.1 und S. 50, Abb. 3.6.2). Eine Analyse, sowie der Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen mit den bereits

bekannten Sequenzen des *atp9* von *Brassica napus* (S.54, Abb. 3.6.4), zeigt ein sehr komplexes Bild. Alle Sequenzen weisen im 3'-Bereich des *atp9* eine ca. 170 Basen lange identische Sequenz auf. Diese hat einen hohen Grad an Übereinstimmung mit einem nichtkodierenden Abschnitt aus dem *nad3-rps12* Bereich in *Brassica napus*. Es kann vermutet werden, dass bei der Transkription dieser Bereich in allen *atp9*-Konfigurationen gleich behandelt wird.

Die von Albaum (1995) für die CMS *Tokumasu* veröffentlichte *atp9*-Sequenz ist in ihrer Organisation mit der von Handa (1993) identisch. Beide bestehen in ihrem 5'- und 3'-Bereich aus einem Mosaik von Teilsequenzen mit 80-99%igen Übereinstimmungen zu anderen mitochondrialen Genbereichen. Interessanterweise findet sich im 3'-Bereich eine Teilsequenz, die in ihrer Zusammensetzung einem Teil des Orf 263 (Landgren *et al.* 1996) entspricht (Abb. 4.6.1). Es ist denkbar, dass diese Region durch Rekombination zwischen

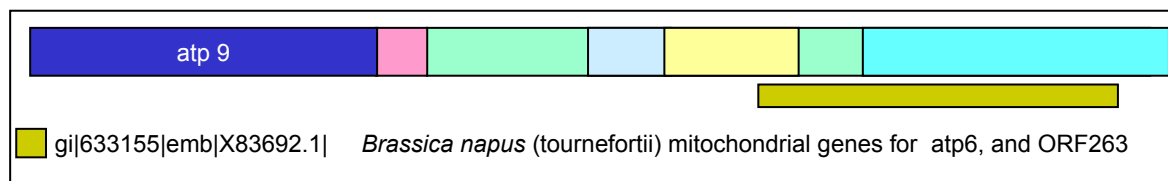


Abb. 4.6.1: Schematische Darstellung der 3'-Region von *atp9* (Handa 1993) in *Brassica napus* und CMS *Tokumasu* (Albaum1995) mit Sequenzähnlichkeiten zu Orf 263

atp6 und *atp9* dupliziert vorliegt. Dies würde das äusserst komplexe Hybridisierungsmuster für die *orf263*-Sonde erklären.

Die von Albaum beschriebene Sequenz des *atp9*-Pseudogens unterscheidet sich sowohl in ihrem 5'- als auch in ihrem 3'-Bereich deutlich von den beiden anderen Sequenzen. Ausser einem grossen Bereich, der keine Ähnlichkeiten zu anderen bekannten mtGenregionen zeigt, findet sich 5' von *atp9* ein Bereich aus der *nad5*-Genregion von *Brassica napus* und im 3'-Bereich eine 23 Basen lange Sequenz, die Teil des 18S rRNA-Gens (Giese *et al.* 1996) in diversen Pflanzen ist. Beide Teile finden sich auch in den in dieser Arbeit untersuchten *atp9*-Genen (Abb. 4.6.2-4.6.4).

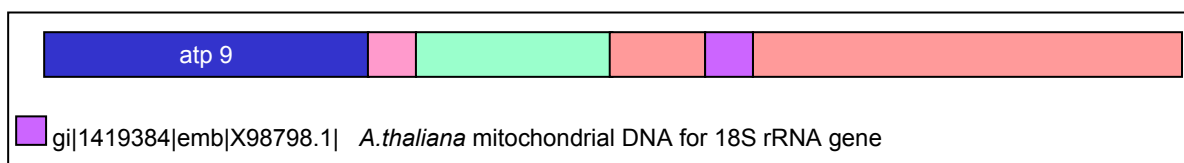


Abb. 4.6.2: Schematische Darstellung der 3'-Region des *atp9* Pseudogens in der CMS *Tokumasu* (Albaum1995) mit Teilsequenz der 18S rRNA

Da die Primer zur Amplifikation jeweils innerhalb des *atp9*-Gens lagen und somit nur flankierende Sequenzen in jeweils 5'- oder 3'-Richtung erhalten wurden, war es für das

hier charakterisierte *atp9-2*-Gen nicht möglich, das 5'-Ende eindeutig zuzuordnen. Es könnte sich hierbei auch um zwei Gene handeln, von dem bei einem der 5'-Bereich und vom anderen der 3'-Bereich amplifiziert wurde.

Der 5'-Bereich ist identisch mit dem von Handa (1993) beschriebenen, so dass zu vermuten wäre, dass der 3'-Bereich ebenfalls gleich ist. Der amplifizierte 3'-Bereich unterscheidet sich jedoch deutlich von dem in Handa (1993) beschriebenen und ähnelt mehr dem 3'-Bereich des *atp9*-Pseudogens (Albaum 1995). Allerdings findet sich als Unterschied eine Duplikation der 23 Basen langen Teilsequenz des 18S rRNA-Gens, die einen Teil aus dem *atp9*-Pseudogen der CMS *Tokumasu* flankiert (Abb. 4.6.3).

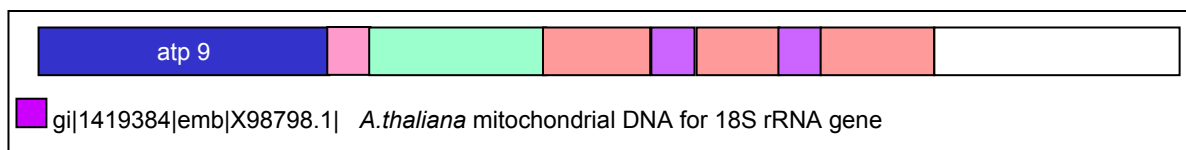


Abb. 4.6.3: Schematische Darstellung der 3'-Region des *atp9-2* in der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ mit duplizierter Teilsequenz der 18S rRNA

Bei *atp9-2* und dem *atp9*-Pseudogen scheint das komplette 18S rRNA Gen im 3'-Bereich von *atp9* durch Rekombination verlagert worden zu sein und lediglich die 23 Basen der Rekombinationsstelle wurden erhalten bzw. dupliziert

Im Falle des hier untersuchten *atp9-2a*-Gens konnte 5'- und 3'-Region eindeutig bestimmt werden. Es ist interessant, dass der 3'-Bereich eingebettet in den identischen Genbereich des *atp9*-Pseudogens, das gesamte 18S rRNA Gen enthält (Abb. 4.6.4).

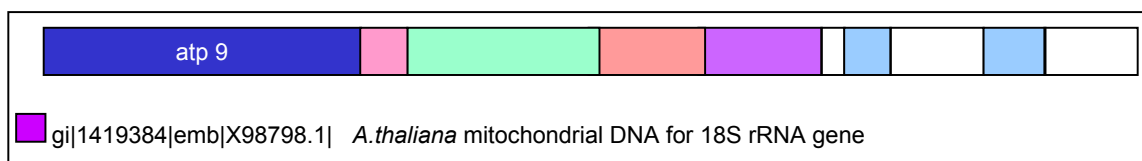


Abb. 4.6.4: Schematische Darstellung der 3'-Region des *atp9-2a* in der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ mit Sequenzbereich der 18S rRNA

Der im Northernblot nachgewiesene, transkribierte 5'-Bereich von *atp9-2a* enthält, wie auch das *atp9* Pseudogen in der CMS *Tokumasu*, einen Teil aus dem *nad5*-Genbereich. Allerdings ist dieser bei *atp9-2a* länger und von unbekanntem Sequenzen flankiert. Im weiteren 5'-Bereich befinden sich dann Sequenzabschnitte, die sich verschiedenen, mehrfach vorkommenden, nichtkodierenden Genbereichen des *Arabidopsis thaliana*-mtGenoms zuordnen lassen. Die Untersuchung auf mögliche offene Leseraster ergab ein durchgehendes Leseraster von -587 bis zum Transkriptionsstop von *atp9* in gleicher Orientierung im

selben Raster. Dieser Orf weist mit 112 von 193 Aminosäuren eine 77%ige Identität zum vom *atp6*-Gen kodierten Protein und mit 182 Aminosäuren eine 50%ige zum Orf 267 im mtGenom von *Beta vulgaris* (Kubo *et al.* 2000) auf. Er würde ein ca. 30 kDa Protein kodieren, das unprozessiert den Einbau der Untereinheit 9 der ATP-Synthase behindern könnte. Die Analyse mittels "DAS-Transmembrane Prediction server" ergibt für den Aminosäurebereich von 168 bis 184 eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen Transmembranbereich. Eine Insertion des Proteins in die innere Mitochondrienmembran und eine daraus resultierende Störung der Energiegewinnung wäre somit denkbar.

Die praktische Anwendung der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ in der Rapszüchtung ist nicht erfolgversprechend, da umfangreiche Freilandversuche gezeigt haben, dass das CMS-System nicht umweltstabil ist, d.h. bei Hitze erfolgt eine Brechung der CMS und die Pflanzen revertieren zu fertilen Individuen (Stiewe, persönliche Mitteilung 2001). Auch im Gewächshausversuch konnte bei Temperaturen ab 26°C über einen längeren Zeitraum festgestellt werden, dass einzelne Pflanzen fertilen Pollen bildeten. Diese Reversion war nicht stabil, bei niedrigeren Temperaturen wurden wieder männlich sterile Blüten gebildet. Dieses Phänomen tritt häufig in CMS-Systemen auf (z.B. CMS *Napus*, *Polima* und *Resyn* im Raps, Stiewe 1993).

Das CMS *Tournefortii* „Stiewe“-System bietet allerdings die Möglichkeit, die Veränderungen und molekularen Ursachen zu erforschen, die dazu führen, dass die Pflanzen wieder fertil werden. So könnte das Verständnis für die physiologischen Prozesse in den Mitochondrien und in der Pflanze erweitert und zum Verständnis der CMS beigetragen werden. Ferner sind eine Reihe von Fragen noch ungeklärt, die von generellem wissenschaftlichem Interesse sind. Durch die CMS kommt es zu einer Degeneration der Mitochondrien und in der Folge zum vorzeitigen Absterben der Tapetumzellen. Dies verhindert die Reifung des Pollens. Eine vergleichende Analyse des programmierten Zelltodes von Tapetumzellen in fertilen Pflanzen und des vorzeitigen Absterbens in männlich sterilen Pflanzen könnte neue Einsichten in die Apoptose erbringen. Eingehende Untersuchungen zur Apoptoseprozessen in normalen Blüten sind schon gemacht worden (siehe Wu *et al.* 2000, Rubinstein 2000), die Einbeziehung von CMS-Phänomenen wird dagegen fast ausschliesslich auf die mitochondriale Ebene beschränkt.

Seit einigen Jahren wird auch an gentechnisch hergestellten CMS-Systemen gearbeitet. Mariani *et al.* (1990) erzeugten transgene Tabakpflanzen, die männlich steril waren. Sie enthielten ein Gen, bei dem ein tapetumspezifischer Promotor mit einem RNase-Gen aus *Aspergillus oryzae* oder *Bacillus amyloliquefaciens* gekoppelt wurde. Die Antherenspezifi-

tät wurde nachgewiesen. Dieses System ist artunabhängig und könnte so in vielen Nutzpflanzen verwendet werden. Ein Problem stellt sich allerdings bei Nutzpflanzen wie Raps, wo die Sterilität zur Samenproduktion wieder aufgehoben werden muss. Dafür müssen Restorerpflanzen über einen weiteren gentechnischen Ansatz dahingehend verändert werden, dass sie die Expression der RNase unterdrücken.

Einen anderen Weg wählten Broer *et al.* (2002) im Raps. Sie koppelten einen tapetumspezifischen Promotor mit einem Deacetylasegen aus *E. coli*. Die heranwachsenden Pflanzen werden zu einem bestimmten Zeitpunkt mit der ungiftigen Herbizidvorläufersubstanz N-Acetyl-Phosphinotricin besprüht. Die in den Antheren aktive Deacetylase wandelt dieses in das Herbizid Phosphinotricin um und die Tapetumzellen sterben ab. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass die Sterilität induziert werden kann. Wird das Herbizid nicht appliziert, so bilden die Pflanzen ganz normal Samen und sind „restauriert“. Allerdings ist die nötige Reinheit der Herbizidvorläufersubstanz ein Problem. Obwohl es sich um eine ungiftige Substanz handelt, kommt es bei den Pflanzen zu Ausfällen wie unter Herbizidapplikation. Es wird eine unbekannte Verunreinigungsquelle bei der Herstellung der Herbizidvorläufersubstanz vermutet (Broer, persönliche Mitteilung 2002).

Angesichts der ablehnenden Haltung der Öffentlichkeit in Bezug auf die Verwendung von gentechnisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von Lebensmitteln sind diese Ansätze jedoch kritisch zu betrachten. Findet in der Bevölkerung kein Stimmungsumschwung statt, was zur Zeit nicht zu erwarten ist, so werden transgene Zuchtsysteme in der Nutzpflanzenzüchtung in Deutschland keine Interessenten finden. Die in dieser Arbeit beschriebenen CMS-Systeme werden, sofern sie keine Restorer haben (z.B. bei der Kohlzucht etc.), zwar vom ökologischen Landbau abgelehnt (<http://www.agoel.de>, <http://www.boelw.de/>), in der Bevölkerung gibt es jedoch bis jetzt keinen Widerstand. Dies könnte allerdings weniger an der „Natürlichkeit“ der CMS als an dem Desinteresse der Öffentlichkeit und der Umweltverbände an diesem Thema liegen.

Die Erzeugung und Erforschung neuer CMS-Systeme zur Pflanzenzüchtung ist also sinnvoll und notwendig. Die Verwendung von einigen wenigen CMS-Systemen in der Pflanzenzüchtung birgt Risiken. So kann bei einem Zusammenbruch eines Systems aufgrund negativer Nebenwirkungen (siehe CMS Texas im Mais S. 10) die ganze Veredlungszüchtung einer Kulturpflanze zusammenbrechen, soweit es keine geeigneten Alternativsysteme gibt, auf die man ausweichen kann.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, das Verständnis der molekularen Mechanismen der Cytoplasmatischen Männlichen Sterilität (CMS) des Raps zu erweitern. Dazu wurden drei Systeme, die unterschiedlich entstanden sind, auf molekularer Ebene untersucht: a) die CMS *Tournefortii* „Stiewe“, die durch asymmetrische Protoplastenfusion von *Brassica napus* (Kerndonor) und *Brassica tournefortii* (Cytoplasmadonor) erzeugt wurde, b) die CMS *Tournefortii* „Landgren“ bzw. CMS *Juncea*, entstanden durch Einkreuzung einer männlich sterilen *Brassica juncea*-Linie in *Brassica napus* und c) die CMS *Tokumasu*, die auf ein aus *Raphanus sativus* (Rettich) in *Brassica napus* überführtes Cytoplasma zurück geht.

Der für die CMS *Tournefortii/Juncea* verantwortlich gemachte Genbereich atp6-Orf 263 sollte in dem vorhandenen Pflanzenmaterial charakterisiert werden. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob er auch in den CMS-Systemen *Tournefortii* „Stiewe“ und *Tokumasu* vorkommt, exprimiert wird und somit als Ursache für die CMS in diesen Systemen in Frage kommen könnte. Ferner wurde versucht, die Ursachen für die CMS der drei Systeme durch Transkriptionsanalyse und mitochondriale Genomvergleiche zwischen fertilen und männlich sterilen Linien zu ermitteln. Durch eine umfangreiche Untersuchung der mitochondrialen Genome der *Brassicaceae Arabidopsis thaliana*, *Brassica tournefortii*, *Brassica napus* und *Brassica oleracea* mittels RFLP-Analyse sollte ihre Stellung untereinander und in Bezug auf die CMS-Systeme untersucht werden. Ausserdem sollte geklärt werden, inwieweit die bekannte mitochondriale Genomorganisation der *Brassicaceae Arabidopsis thaliana* zum Vergleich mit anderen *Brassicaceae* herangezogen werden kann.

Die Übereinstimmung der mitochondrialen Genomorganisation von *Arabidopsis thaliana* mit den getesteten *Brassica*-Arten beträgt in der RFLP-Analyse zwischen 8% und 14%. Somit ist sie als Vergleich für andere *Brassicaceae* nicht geeignet. Obwohl die CMS *Tournefortii* „Stiewe“ durch asymmetrische Protoplastenfusion und die CMS *Juncea* durch natürliche Bastardisierung entstanden sind, zeigt die RFLP-Analyse mit 25 mitochondrialen Sonden und fünf verschiedenen Restriktionsenzymen eine hohe Übereinstimmung (74 bis 81%) in der mitochondrialen Genomorganisation, sowohl zwischen den CMS-Linien als auch in Bezug auf den Plasmadonor *Brassica tournefortii*. Die Übereinstimmung mit dem Kerndonor *Brassica napus* liegt mit 51% bis 58% höher als die zwischen Plasma- und Kerndonor (49%). Die Anzahl der Rekombinationsereignisse oder Verschiebungen in der Sublomonstöchiometrie aufgrund der Protoplastenfusion von *Brassica tournefortii* und *Brassica napus* beträgt ca. 11%. Die CMS *Tokumasu* zeigte aufgrund der Cytoplasmaherkunft aus *Raphanus sativus* in der RFLP-Analyse nur eine Übereinstimmung von 46% bis

53% und bestätigt die grosse Verschiedenheit zu den *Brassica*-Linien. Ausser des bereits beschriebenen Kotanskripts von *atp9* (Albaum 1993) wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede gefunden, die auf die Ursache für die CMS hindeuten.

Darüber hinaus ist es in der vorliegenden Arbeit anhand umfangreicher Vergleiche der mitochondrialen Genome und der mitochondrialen Transkriptionsprofile gelungen, die CMS *Tournefortii* „Stiewe“ sowohl von der CMS *Tournefortii* „Landgren“ als auch von der CMS *Juncea* und *Tokumasu* abzugrenzen. Dazu wurde in den *Brassicaceae* ein systematisches Transkriptionsprofil für 25 mitochondriale Gene der Atmungskette und der Energiegewinnung erstellt. Es konnte gezeigt werden, dass der Genbereich *atp6*-Orf 263 zwar in allen untersuchten Linien existiert, jedoch nur in der CMS *Juncea* exprimiert wird. Damit scheidet er als Ursache für die männliche Sterilität der CMS *Tournefortii* „Stiewe“ aus. Desweiteren wurden Unterschiede in der Transkription zwischen den fertilen Rapslinien „Duplo“ und „Andor“ gefunden, die sich auf die unterschiedlichen Kernhintergründe der Sorten zurückführen lassen. Der Anteil liegt bei 24% der untersuchten Gene.

Bei der Transkriptionsanalyse der CMS-Systeme *Tournefortii* „Stiewe“ und CMS *Juncea* wurden vier Kandidatengene (*atp9*, *nad2*, *nad9*, *cob*) als mögliche Ursache der männlichen Sterilität identifiziert. Zwei davon (*atp9* und *cob*) wurden näher untersucht. Für das Apocytochrom b-Gen (*cob*) wird eine Modifikation in der Transkription angenommen, die entweder im Bereich *rps14-cob* oder im 3'-Bereich von *cob* liegt. Die Untersuchungen des *atp9*-Genbereichs ergaben in beiden CMS-Linien mindestens zwei Genkonfigurationen, von denen eine (*atp9-2a*) bisher nicht beschrieben ist. Diese besitzt im 5'-Bereich ein mit *atp9* kotranskribiertes offenes Leseraster von 193 Aminosäuren, das eine Ähnlichkeit zum Genprodukt von *atp6* aufweist. In der fertil restaurierten Linie scheint dieses Transkript vermindert. Das *atp9-2a*-Kotranskript kommt als Ursache für die CMS in Frage. Weiterführende Experimente zur Charakterisierung, sowie zur Translation und Lokalisation des Proteins in den Mitochondrien müssen noch unternommen werden.

6. Literaturverzeichnis

- Albaum M, (1993)
Dissertation Universität Hamburg
- Albaum M, Lührs R, Trautner J, Abel W O, (1995)
Plant Mol. Biol. **29**(1): 179-85
- Arnold C, Hodgson I J, (1991)
PCR Methods Appl. **1**: 39-42
- Aubourg S, Boudet N, Kreis M, Lecharny A, (2000)
Plant Mol. Biol. **42**: 603-613
- Backert S, Dörfel, P, Börner T, (1995)
Curr. Genet. **28**, 390-399
- Backert S, Lurz R, Oyarzabal O A, Börner T, (1997)
Plant Mol. Biol. **33**: 1037-1050
- Banneroth H, Boilidard L, Cauderon Y, Temple J, (1974)
In: *Proc. Eucarpia Meeting Cruciferae* 52-54
- Bellaoui M, Pelletier G, Budar F, (1997)
EMBO **16**(16): 5057-5068
- Bellaoui M, Grelon M, Pelletier G, Budar F, (1999)
Plant Mol. Biol. **40**: 893-902
- Bendich A J, (1996)
J. Mol. Biol. **255**: 564-588
- Bentolila S, Antonio, A, Hanson A, Hanson, M, (2002)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**(16): 10887-10892
- Bino R J, (1985)
Protoplasma **127**: 230-240
- Bonhomme S, Budar F, Férault M, Pelletier G, (1991)
Curr. Genet. **19**: 121-127
- Bonhomme S, Budar F, Lancelin D, Small I, Defrance M F, Pelletier G, (1992)
Mol. Gen. Genet. **253**: 240-248
- Brennicke A, Zabaleta E, Dombrowski S, Hoffmann M, Binder S, (1999)
J. Hered. **90**: 345-350
- Broer I, Köhne S, Sonntag K, Neumann K, (2002)
Votr. Pflanzenzüchtung **54**: 345-348

- Brown W M, George M, Wilson A C, (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 1967-1971
- Caetano-Anollés G, Brant, J B, Gresshoff P M, (1992)
Mol. Gen. Genet. **235**: 157-167
- Conley C A, Parthasarathny M V, Hanson M R, (1994)
Am. J. Bot. **81**: 630-640
- Corriveau J L, Coleman A W, (1988)
Am. J. Bot. **75**: 1443-1458
- Cui X, Wise R P, Schnable P S, (1996)
Science **272**: 1334-1336
- Debener T, Mattiesch L, (1998)
Plant Breeding **117**: 147-151
- Devon R S, Porteous D J, and Brookes A (1995)
Nucleic Acids Res. **23** (9): 1644-1645
- Dewey R E, Timothy D H, Levings C S III, (1986)
Cell **44**: 439-449
- Dewey R E, Timothy D H, Levings C S III, (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 5374-5378
- Don R H, Cox P T, Wainwright B J, Baker K, Mattick J S, (1991)
Nucleic Acids Res. **19** (14):4008.
- Dumas Milne Edwards J B, Delort J, Mallet J, (1991)
Nucleic Acids Res. **19**: 5227-5232
- Dumas Milne Edwards J B, Valdenaire O, Mallet J, (1997)
Methods Mol. Biol. **67**: 261-78.
- Erickson L, Kemble R, (1990)
Mol. Gen. Genet. **222**: 135-139
- Erickson L, Kemble R, (1993)
Sex. Plant Rep. **6**: 33-39
- Fauron C M-R, Abbott A G, Brettell R I S, Gesteland R F, (1987)
Curr. Genet. **11**: 339-346
- Forde B G, Leaver C J, (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 418-422
- Fourgoux-Nicol A, Drouaud J, Haouazine N, Pelltier G, Guerche P, (1999)
Plant. Mol. Biol. **40**: 857-872

- Gagliardy D, Perrin R, Maréchal-Drouard L, Grienenberger J-M, Leaver C J, (2001)
J. Biol. Chem. **276**(47):43541-43547
- Gengenbach B G, Green C E, Donovan C M, (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5113-5117
- Giese A, Thalheim C, Brennicke A, Binder S, (1996)
Mol. Gen. Genet. **252**(4):429-36
- Gray M W, Burger G, Lang B F, (1999)
Science **283**: 1476-1481
- Gulifoyle R A, Leeck C L, Dubear Kroening K, Smith L M, Guo Z, (1997)
Nucleic Acids Res. **25**(9): 1854-1858
- Haakansson G, Glimelius K, (1991)
Mol. Gen. Genet. **229**: 380-388
- Hack E, Lin C, Yang H, Horner H T, (1991)
Plant Physiol. **95**: 861-870
- Handa H, Nakajima K, (1992)
Curr. Genet. **21**(2):153-159.
- Handa H, (1993)
Jpn. J. Genet. **68** (1): 47-54
- Handa H, Mizobuchi-Fukuoka R, Pinyarat W, (1997)
Curr. Genet. **31**: 336-42
- Hanson M R, Sutton C A, Lu B, (1996)
Tends Plant. Sci. **1**: 57-64
- Hecker K H, Roux K H, (1996)
Biotechniques **20** (3):478-85.
- Itani K, Handa H. (1998)
Curr. Genet. **34** (4): 318-325
- Izhar S (1984) in: Selbstinkompatibilität K C (ed.),
Monographs on TAG: Petunia; Springer Verlag Heidelberg, 77-91
- Knoop V, Schuster W, Wissinger B, Brennicke A, (1991)
EMBO **10** (11): 3483-3493
- Köhler F E, (1887)
Köhler's Medizinalpflanzen, Verlag Fr. Eugen Köhler in Gera.
- Korth K L, Kaspi, C I, Siedow J N, Levings C S III, (1991)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 10865-10869

- Kück U, Godehardt I, Schmidt U (1990)
Nucleic Acids Res. **18** (9), 2691-2697
- Kubo T, Nishizawa S, Mikami T (1999)
Mol. Gen. Genet. **262**, 283-290
- Kubo T, Nishizawa S, Sugawara A, Itchoda N, Estiati A, Mikami T (2000)
Nucleic Acids Res. **28** (13), 2571-2576
- Lamkey K R, Edwards J W, (2002) *The Quantitative Genetics of Heterosis*
<http://www.agron.iastate.edu/corn/Lamkey/Publications/PDF/heterosis.pdf>
- Landgren M, Zetterstrand M, Sundberg E, Glimelius K, (1996)
Plant Mol. Biol. (**32**): 879-890
- Lang B F, Gray M W, Burger G, (1999)
Annu. Rev. Genet. **33**: 351-397
- Laroche J, Li P, Bousquet J, (1995)
Mol. Biol. Evol. **12**: 1151-1156
- Laser K D, Lersten N R (1972)
Bot. Rev. **38**: 425-454
- Laughnan J R, Gabay-Laughnann S, (1983)
Annu. Rev. Genet. **17**: 27-48
- Lee S-L J, Warmke H E (1979)
Am. J. Bot. **66**: 141-148
- Levings C S III, Pring D R, (1976)
Science **193**: 158-160
- Leon J, (1991)
Crop Science **31**(2): 281-284
- L'Homme Y, Stahl R J, Li X-Q, Hameed A, Brown G G, (1997)
Curr. Genet. **31**(4): 325-335
- Mackenzie S A, Pring D, Bassett M, Chase C, (1988)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 2714-2717
- Mackenzie S A, Chase C, (1991)
Plant Cell **2**: 905-912
- Mackenzie S A, Shichuan H, Lyznik A, (1994)
Plant Physiol. **105**: 775-780
- Makaroff C A, Apel I J, Palmer J D (1989)
J. Biol. Chem. **264** (20): 11706-11713

- Makaroff C A, Apel I J, Palmer J D (1991)
Curr. Genet. **19** (3), 183-190
- Makaroff C A (1995) in: Leaver III C S, Vasil I K (eds.)
Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants, Kluwer Academic Publishers,
Dordrecht, Boston, London **3**: 515-550
- Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg R B, (1990)
Nature **347**: 737-741
- Marienfeld J., Unseld M., Brandt P. and Brennicke A, (1996)
DNA Res. **3** (5): 287-290
- Marienfeld J, Unseld M, Brennicke A (1999)
Trends in Plant Science **4**(12): 495-502
- Martinez-Zapater, J M, Gil P, Capel J, Somerville, C R (1992)
Plant Cell **4**: 889-899
- Maruyama K, Sugano S, (1994)
Gene **138**: 171-174
- Mathias R, (1985)
Zeitschrift für Pflanzenzüchtung **95**: 371-374
- Miele G, Slee R, Manson J, Clinton M, (1999)
Prep. Biochem. & Biotechnol. **29**(3): 245-255
- Mihr C, Baumgärtner M, Dieterich J-H, Schmitz U K, Braun H-P, (2001)
J. Plant Phys. **158**: 787-794
- Money T, Reader S, Li J Q, Dunford R P, Moore G, (1996)
Nucleic Acids Res. **24**(13): 2616-2617
- Nagata N, Saito C, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T (1999)
Planta **209**: 53-65
- Nass S, Nass M M K, (1963)
J. Cell Biol. **19**, 593-629
- Nivison H T, Hanson M R, (1989)
Plant Cell **1**: 1121-1130
- Nivison H T, Sutton C A, Wilson R K, Hanson M R, (1994)
Plant Journal **5**: 613-623
- Nugent J M, Palmer J D (1993)
Curr. Genet. **23** (2): 148-153
- Nunnari J, Marshall WF, Straight A, Murray A, Sedat J W, Walter P, (1997)
Mol. Biol. Cell. **8**(7):1233-42

- Oda K, Yamato K, Ohta, E., Nakamura Y, Takemura M, Nozato N, Kohchi T, Ogura Y, Kanegae T, Akashi K, Ohyama K (1992)
J. Mol. Biol. **223** (1), 1-7
- Ogura H, (1968)
Me. Fac. Agric. Kogoshima Univ. **6**: 39-78
- Padegimas L S, Reichert N, (1998)
Anal. Biochem. **260**: 149-153
- Palmer J D, Shields C R, Cohn D B, Orton T J, (1983)
Theor. Appl. Genet. **65**: 181-189
- Palmer J D, Herbon L A, (1987)
Curr. Genet. **11**: 565-570
- Palmer J D, Herbon L A, (1988)
J. Mol. Evol. **28**: 87-97
- Paulmann W, Röbbelen G, (1988)
Plant Breeding **100**: 2099-309.
- Pelletier G, Primad C, Vedle F, Chetrit P, Remy R, Rouselle M, Renard M, (1983)
Mol. Gen. Genet. **191**: 244-250
- Polowick P L, Sawhney V K, (1987)
Can. J. Bot. **65**: 807-814
- Pring D R, Lonsdale D M, (1989)
Annu. Rev. Phytopathol. **27**: 483-502
- Quetier F, Vedel F, (1977)
Nature **268**: 365-368
- Rawat D S, Anand I J, (1979)
Indian J. Genet. **39**: 412-414
- Renard M, Delourme R, Mesquida J, Pelletier G, Primard C, Bouligard L, Dore C, Ruffio V, Herve Y, Morice J, (1992) In: Dattée Y, Dumas C, Gallais A, (eds.)
Reproductive Biology and Plant Breeding, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 107-120
- Rhoades M M, (1943)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **29**: 327-329
- Rhoads D M, Kaspi, C I, Siedow J N, Levings C S III (1994)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 8253-8257
- Röbbelen G, in: Hoffmann W, Mudra A, Plarre W; (1985)
Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen; Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg, **2**: 289-302

- Rogers J S, Edwardson J R, (1952)
Agron. J. **44**: 8-13
- Rogers S O, Bendich A J, (1994) in: Gelvin S, Schilperoot RA (eds)
Plant Mol. Biol. Manual. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts,
D1: 1-8
- Rubinstein, B, (2000)
Plant Mol. Biol. **44**: 303-318
- Rudloff E, Schweiger W, (1984)
Arch. Züchtungsforschung, **5**: 327-334
- Sambrook J, Fritsch E F Maniatis T, (1989)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press,
NY
- Schägger H, Jagow G, (1991)
Anal. Biochem. **199**: 223-231
- Schirzadegan M, Palmer J D; Christey M, Earle E D, (1991)
Plant Mol. Biol. **16**: 21-37
- Schnable P S, Wise R P, (1998)
Trends in Plant Science **3**(5): 175-180
- Sernick J L, Stefansson B R, (1983)
Canadian Journal of Plant Science **63**: 407-414
- Shull G, (1952) in: Gowen J W (ed),
Heterosis Iowa State College Press, Ames 14-48
- Small I D, Isaac P G, Leaver C J, (1987)
EMBO Journal **6**: 865-869
- Small I D, Peeters N, (2000)
Trends Biochem. Sci. **25**: 46-47
- Smart C J, Monéger F, Leaver C J, (1994)
Plant Cell **6**: 811-825
- Smith A G, Pring D R, (1987)
Curr. Genet. **12**: 617-623
- Sodhi Y S, Pradhan, A K, Verma J K, Arumugam N, Mukhopadhyay A and Pental D (1994)
Plant Breeding **112**: 223-227
- Southern E M (1975)
J. Mol. Biol. **98**: 503-517
- Stiewe G, (1993)
Dissertation Georg-August-Universität Göttingen

- Stiewe G, Röbbelen G, (1994)
Plant Breeding **113**: 294-304
- Stiewe G, Witt U, Hansen S, Theis R, Abel W O, Röbbelen G, (1995)
in: Kück U, Wricke G (eds.) Genetic mechanisms for hybrid breeding.
Adv. Plant Breed. **18**: 59-76
- Tatum L A, (1971)
Science **171**: 1113-1116
- Tokumasu S, (1951)
Sci. Bull. Faculty of Agric. Kyushu Univ. **13**: 83-89
- Troutt A B, McHeyzer-Williams M G, Pulendran B, Nossal G J V, (1992)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 9823-9825
- Unsold M, Marienfeld J R, Brandt P, Brennicke A, (1997)
Nat. Genet. **15**: 57-61
- Vaughn J G (1977)
Bioscience **27**: 35-40
- Ward B L, Anderson R S, Bendich A J, (1981)
Cell **25**: 793-803
- Warmke H E, Lee S-H J, (1978)
Science **200**: 561-563
- Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V, (1990),
Nucleic Acids Res. **18**(22): 6531-5
- Wise R P, Fliss A E, Pring D R Gengenbach B G, (1987)
Plant Mol. Biol. **9**: 121-126
- Wise R P, Gobelman-Werner K, Pei D, Dill C L, Schnable P S, (1999)
J. Hered. **90**(3): 380-385
- Witt U, Lühns R, Buck F, Lembke K, Grüneberg-Seiler M, Abel W, (1997)
Plant Mol. Biol. **35**: 1015-1021
- Wolfe K H, Li W-H, Sharp P M, (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 9054-9058
- Wolfe K H, Sharp P M, Li W-H, (1989)
J. Mol. Evol. **29**: 208-211
- Wolstenholme D R, (1992)
Current opinion in Genetics and Development **2**: 918-925
- Wu H-M, Cheung A Y, (2000),
Plant Mol. Biol. **44**: 267-281

Yang Y-W, Lai K-N, Tai P-Y, Li W-H, (1999)
J. Mol. Evol. **48**: 597-604

Ye F, Bernhardt J, Abel W O, (1993)
Curr. Genet. **24**(4): 323-329

Internetadressen

Arbeitsgemeinschaft Ökologischer Landbau (2002)
<http://www.agoel.de/projekte/saatgut.htm#projektbeschreib>
Ab Herbst 2002: <http://www.boelw.de/>

BLAST-Programme (2002)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

CLUSTALW (2002)
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

"DAS"-Transmembrane Prediction server (2002)
<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>

Digoxigenin System-Benutzerhandbuch (2002)
http://www.roche-applied-science.com/prodinfo_fst.htm?/prod_inf/manuals/dig_man/dig_toc.htm

International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) (2002)
<http://www.cimmyt.org/Research/Maize/qpm2002/Seed/fig1.htm>

"Translate" von ExpASy (2002)
<http://au.expasy.org/tools/dna.html>

"ORF-Finder" (2002)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>

Primerdesignprogramm Primer3 (2002)
http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

Promega Vektorsequenzen (2002)
<http://www.promega.com/vectors/pgemt.txt>

Restriction Enzyme Analysis Program (2002)
<http://darwin.bio.geneseo.edu/~yin/WebGene/RE.html>

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e. V. (2002)
<http://www.ufop.de>

USDA-National Agricultural Statistics Service (2002)
<http://www.usda.gov/nass/pubs/histdata.htm>

7. Anhang

7.1 Primersequenzen

7.1.1 RAPD-Primer

5'–3' Orientierung

OPM1	GTTGGTGGCT
OPM2	ACAACGCCTC
OPM3	GGGGGATGAG
OPM4	GGCGGTTGTC
OPM5	GGGAACGTGT
OPM6	CTGGGCAACT

7.1.2 Splinkerette-Primer

5'–3' Orientierung

SPLNK-TOP	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATTCGTACGAGAATCGCTGC TCTCTCCAACGAGCCAAGA
SPLK-0:	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAA
SPLK-1:	TCGTACGAGAATCGCTGTCTCTCC
SPLNKECORI:	AATTTCTTGGCTCGTTTTTTTTTGCAAAAA
SPLNKHINDIII:	AGCTTCTTGGCTCGTTTTTTTTTGCAAAAA
SPLNKBAMHI:	GATCTCTTGGCTCGTTTTTTTTTGCAAAAA
FATP9:	CAACCCGAGATGTTAGAAGG
RATP9:	GCAATAGCTTCGGTTAGAGC
R3'D34ATP9:	AAACGGACTTCACTAGCTGAT
R3'D34ATP9-2A:	AGGTTCTACCACTGCAGGG
R3'DH1ATP9:	AACGCTCGACCGAAGAAATG

7.2 Sonden- und Gensequenzen

Die verwendeten Primer sind fett hervorgehoben, die Restriktionsstellen sind unterstrichen. Die Position im mitochondrialen Genom von *A. thaliana* sind bezogen auf den Genbankeintrag des NCBI (gi: 13449290, NC-1284.1) Alle Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung notiert.

1. Sonde atp1

302 Bp *A.t.* 30291 – 303610

ATP1F	CACTTCGACACGTCTTTGC
ATP1R	GTGGTCTCAGTTGGAGATGG

CACTTCGACACGTCTTTGCTCGTGATCGCTTAGAGCCCCTCTTCCATCAATAGGTACTC
CATCGCGTCCGACCACACGCCCTAGCATAGCCTTTCCCGCGGGAACATCCACAATAGACCAGTGC
GCTTGACAAGATCTCCTTCTTTTATAGCGGTATCACCACCAAAGACAACAATCCCGACATTCTCAT
TCTCAAGATTCAAGGCCATTCTTTTACACCGTTGGCAAAAAGAACCATTTCCCAGCTTGAATCT
CGTTCAATCCATAAACTTGTGCAAT**CCATCTCCACTGAGACCAC**
DpnII /gatc 24, 116, 135

2. Sonde atp6369 Bp *A.t.* 112531 – 112901 und atp6a 296825-297195

F1ATP6 TTATTGGCATTACTATAGTGG
R1ATP6 GAGATTTATAGCATCATTCAAG

TTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAGACATGGGCTTCATTTTTTCAGCTTTTTAT
TACCCGCAGGAGTCCCCTGCGTTAGCACCTTTTTAGTACTCCTTGAGCTAATTTCTT
ATTGTTTTCGCGCATTAAAGCTTAGGAATACGTTTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATA
GTTTAGTAAAGATTTTAAAGTGGGTTGCTTGGACTATGCTATGTATGAATGAGATTTTCT
ATTTTATAGGGCTCTTGGTCTTTATTTATAGTTCTTGCATTAACCGGTCTGGAATTAG
GTGTAGCTATATTACAAGCTTATGTTTTTACGATCTTAATCTGTATTT**ACTTGAATGATG**
CTATAAATC

DpnII /gatc 331BsrBRI gatnn/nnatc 3313. Sonde atp9186 Bp *A.t.* 278918 - 279105

ATP9F CAACCCGAGATGTTAGAAGG
ATP9R GCAATAGCTTCGGTTAGAGC

CAACCCGAGATGTTAGAAGGTGCAAATAATAGGTGCCGGAGCTGCTACAATTGCTTCAGC
GGGAGCTGCTATCGGTATTGGAAACGTCTTCAGTTCTTTGATCCATTCTGTGGCGCGAAA
TCCATCATTGGCTAAACAATCATTTGTTATGCCATTTTGGGCTTT**GCTCTAACCGAAGC**
TATTGC

DpnII /gatc 1004. Sonde cox1297 Bp *A.t.* 35032 – 35330 revers zu *Raphanus sativus*

COX1F AAGAGCCAAAACCTGGAAAGG
COX1R TTCAGGGCTAGACATTGCTC

AAGAGCCAAAACCTGGAAAGGGCATTCCATCCAGCGTAAGCATCTGGATAATCTGGAATAC
GACGTGGCATACTGAAAGCCCTAAGAAATGCATAGGAAAGAAGGTCAAATTAACCCCGA
AAAAAGTGATCCAAAATGGATTTGACCTAAAGTTTCAGGGTATGTCCGACCAAAGATTT
TACCCACCCAATAGTAAAATCCTGCAATAAAGCAAAAACGGCTCCCATAGAAAGTACAT
AATGGAAATGTGCAACCACATAATAAGTATCATGT**AGAGCAATGTCTAGCCCTGAA**

DpnII /gatc 1285. Sonde cox2276 Bp *A.t.* 41946 - 42221

COX2F TTCCACAAATCTCACTGCAC
COX2R GTTCCGATGAGCAGTCACTC

TTCCACAAATCTCACTGCACTGACCATAGTAACTCCTTCTCGTTGTACCAAATAGAGA
TTTGATTTAAACGACCAGGTACAGCATCACATTTGACACCTGAGGAAGGTACAGCCCAAC
TATGAGGTACATCAGCAGATGTTACAATAATGCGTAGATGAGTTTTGGCTGGTACAACCA

CTCTATTGTCCACTTCTAATAAACGTGATTGACCCAATTCTAGATCTTCTTCTGGAATCA
TATAACTGTCAAAAGTGAGTGACTGCTCATCGGAAC

DpnII /gatc 223

6. Sonde cox3

305 Bp A.t. 218717 - 219021

COX3F GTAACCTGGGCTCATCATGC
COX3R ACAAAATGCCAGTACCATGC

GTAACCTGGGCTCATCATGCTATACTCGCGGGGAAGGAAAAACGAGCAGTTTATGCTTTA
GTAGCTACCGTTTTACTGGCTCTAGTATTTACTGGCTTTCAAGGAATGGAATATTATCAA
GCACCCTTCACTATTTCCGGATAGTATTTATGGTTCTACCTTTTTCTTAGCAACAGGCTTT
CATGGTTTTCATGTGATTATAGGTAATCTTTTCTTGATTATATGTGGTATTCGGCAATAT
CTTGGTCATCTGACGAAGGAGCATCACGTTGGCTTTGAAGCAGCT**GCATGGTACTGGCAT**
TTTGT

keine Schnittstellen

7. Sonde nad1

206 bp A.t. 143221 - 143426

NAD1F AAGGAAGCCATTGAAAGGTG
NAD1R TCCCATTTTCAAGAAGATCC

AAGGAAGCCATTGAAAGGTGACTAAAAGACCAGAAACAGGGACTACCCGAGCTAATGATA
GAGGCAAGAACAACCTTTCCGGCCAAGTCCCATTAATTGATCATAACGATATCGTGGAATG
CTGCACGGACCCATATATATAGGAACAGAAAGAGAAGAACCTTGATACTAAACCAGATCG
AGCCCGGGATCTTCTTGAAAATGGGA

DpnII /gatc 97 176 188

XmaI c/ccggg 183

8. Sonde nad2

302 Bp A.t. 129758 – 130060

NAD2F ATCTCTATGCCCCCTTTTTC
NAD2R GGTGTGAAAGCAGTTGGTTC

ATCTCTATGCCCCCTTTTTCTTGGTTTTCTCCCATGCTTTTTGTTGGTCAACAACCAACCA
CAACTTTCTATAGTTCTTCACTACTCCTAGAGGCTTGACGGAGTGAAGCTGTCTGGAGGG
AATCATTTTGTGAAATCAATTAATCTAATCATGCCTCAACTGGATAAATTCACCTATTT
TTCACAATTCTTCTGGTTATGCCTTTTCTTTACTTTCTATATTTTCATATGCAATGA
TGGAGATGGAGTACTTGGGATCAGCAGAATTCATAAACTAC**GAACCAACTGCTTTCACA**
CC

ApoI r/aatty 167 267

DpnII /gatc 259

EcoRI g/aattc 267

9. Sonde nad3

235 Bp A.t. 260714 – 260948

BNNAD3F TTGATCCTACTCGGTGTTCC
 BNNAD3R CCATCATGGACCAAAATCC

TTGATCCTACTCGGTGTTCCTTTTCCATTTGCTTCCAATAGTTCAACCTACCCAGAAAAA
 TTGTCGGCCTACGAATGTGGTTTCGATCCTTCCGGTGATGCCAGAAGTCGTTTCGATATA
 CGATTTTATCTTGTTTCAATTTTATTTTAAATCCCTGATCTGGAAGTCACCTTTTCTTT
 CCTTGGGCAGTACCTCCCAACAAGATTGATTTGTTT**GGATTTTGGTCCATGATGG**

DpnII /gatc 3 85 15710. Sonde nad4

322 Bp A.t. 163796 – 164116

NAD4F GCGCCAAATCTTTCTATGG
 NAD4R AGATTCATATGGGCTACTGAGG

GCGCCAAATCTTTCTATGGATTGCTTCTTTTCGCCTCTTTTCGCCGTCAAAGTGCCTATGGT
 ACCAGTTCATATTTGGTTACCCGAAGCTCATGTAGAGGCACCTACGGCAGGATCCGTCAT
 CTTGGCAGGAATTCCTTTAAATTTGGAACCCACGGGTTTTTAAGATTTTCAATACCCAT
 GTTTCCCGAAGCGACACTTTGTTCTACTCCTTTTCAATTAATACTTTAAGCGCGATTGCTAT
 AATATACTTCTTGACCACTTCAAGACAGATCGATCTAAAGAAGATCATTGCTTACT**C**
CTCAGTAGCCCATATGAATCT

ApoI r/aatty 129 140EcoRI g/aattc 12911. Sonde nad4L

216 bp A.t. 188960 – 189175

NAD4LF GCAATAGTACCTCGGACTCG
 NAD4LR GGAATCCTCCTTAATAGACG

GCAATAGTACCTCGGACTCGGAAAGTTATAACGAAAATGGCTAACCCAATAGCGGATTCC
 GCAGCTGCCACCGTTGGAACCAATGAAGCAAATACTTGACCCATCATATCATCCGAAGAA
 ACGGAAAATACCAAAAAGTTCCG**AATTC**CACAGCTAATAACATTGATTCAATTGGCATTGAC
 ATAATAGGAATATTT**CGTCTATTAAGGAGGATTCCC**

ApoI r/aatty 142EcoRI g/aattc 14212. Sonde nad5

207 Bp A.t. 21728 – 21934, es fehlen 27 Basen bis zum 3'-Primer

NAD5F CAATCGTCGGAATGTGTACG
 NAD5R GCGTATAATGTAAATCCCGTAGC

CAATCGTCGGAATGTGTACGAGATACCATAAGGGCCCAATATCTCAATAGCACCTTTGTC
 TAAAGCTTGAATGAGACTTCATATCCGAAACGCAGGAACG**ATCT**GACTAGAAAGTCATT
 CAAAAC**TGATC**GAAGAACCAGCGTTTATTGAAGAAGCTATAGAGTCGATTACAAAAAGT

ACTAGTTTGAAAGGCTCGTTGGAATTG

DpnII /gatc 101 129

13. Sonde nad6

299 bp *A.t.* 76700 – 77000 revers zu *B. campestris*

NAD6F GCATTTTCGTCGGAATACATC
NAD6R CCAGTGAGTGGGATTATTGG

GCATTTTCGTCGGAATACATCCTGTCTTTTCACCTTAGTAGTCCTATGCATAGTCAGTACT
ATAGCCCCAATCATGGCTACTAATAAAATAAGACTAGGAACCAAAAACCAGACAGAATAG
TAGGTATAAAGTAAATTTCCCAATGTTTCCAAATTAGTCCAACCTTCGTACCTTTCCGGCA
TAAACCGTATATCTAAGAGAGGTCGTATTTCTTTGGGTTGGTAGTAATGGAATGCTTTCA
TTATCTAAAATGAAAAACATTTCCACCAAAAAGATCAGT**CCAATAATCCCACCTCACTGG**

DpnII /gatc 273

14. Sonde nad7

301 Bp *A.t.* 134317 - 134617

NAD7F CTATGATGGCCCAAGAACAC
NAD7R TCTCGACATAAGCCAAGAGG

CTATGATGGCCCAAGAACACGCTCATTCTTCAGCTGTAGAGAACTTTTGAATTGCGAGG
TACCATTACGAGCTCAATATATACGAGTGTTATTCCGTGAAATAACTCGAATTTCAAATC
ATTCACCTTGCTTTAACTACTCATGCTATGGATGTGGGAGCATTAACTCCGTTCTGTGGG
CTTTTGAGGAGCGGGAGAAATTGTTGGAATTCATGAAAGAGTCTCGGGAGCCAGGATGC
ATGCCAGTTTCATACGACCAGGTGGAGTGGCACAAGATCTGCCTCTTGGCTTATGTGCGAGA

ApoI r/aatty 109 207

DpnII /gatc 276

EcoRI g/aattc 207

15. Sonde nad9

273 Bp *A.t.* 23701 – 23975

NAD9F CGAAATAGCGAAATTCTTGG
NAD9R TGTACAAACCAGTGCAGACG

CGAATAGCGAAATCTTGGGTCATCTCAATGGGTTTCAGAAACACACGTTTCTCTGGATCATCATA
GCGTACTTCCACATATCCACTCGGAGGAAGGTCTTTTCGTAATGGATGACCCTCGGAACCATAAT
CTGTTGATATACGGCGTAGATCCGGATGATTGATGAAAGAAACACCAAACATATCCTAAACTTCTC
GCTCCACCGGCCGGCTGATGAAATAGACTTACTACCGGAGATATTCTGTTACTT**CGTCTGCA**
CTGTTTTGTACA

ApoI r/aatty 10

DpnII /gatc 56 149

16. Sonde ccb203305 Bp *A.t.* 257016 – 257320 revers zu *B. campestris*

CCB203F CGGTCATTAGAAGGAAGAACC
 CCB203R TTTAACCGTAGGCATCTTGC

CGGTCATTAGAAGGAAGAACCACCATAAAAAGATTCTCTCGTGTATCATCTGTAGCAAAAC
 TATGAACGGGAGCTAGCAATCCGGACCGTATTGAAAAGGTTCTAAGACACAGCATGGAA
 AAGTCACAATATTAAGAAACGAGGTCCAAGAATGAAGAAGGGTAAAATTACAGAATGAA
 TACGAGCTGTGGCTAATACCCGAGGCATAAAGAAGCATTCTACGGGATCCCGAAACC
 ACCAGCCACCCCGACCTAATTCATGATAAGCCCACCAACTTCCGG**CAAGATGCCTACGGT**
TAAA

DpnII /gatc 22917. Sonde BNccb206309 Bp *A.t.* 30862 - 30553 revers zu *A.t.*

BNCCB206F GTAACGCCCTTAATGCTAGG
 BNCCB206R CCACACAGAAGAGTCAAGACC

!GTAACGCCCTTAATGCTAGGTTTTGAAAAGACTTTTCATGTCATTCCCATTAGGTCCG
 ATTCGGATCCCTCCGTTGTTTCCTTTCTCCCGCACCTTTCTCGAAATGAGAAAGAA
 GATGGTACACTCGAATTGTATTATTAAGTACTTATTGCTTGCCAAAGATCCTACTTCTA
 CAATTGGCGGGTCACCGGTTATTCAAATAAGTCGTGTTTTCTGTGGTTTTCCCATGTTA
 CAACTTTCGTACCAATTCGGT**CGATCCGGAATGGATCGGTTAAACATTCCATTAGGGAGC**
CGGTCTTGACTCTTCTGTGTGG

BsrBRI gatnn/nnatc 60DpnII /gatc 66 168 263 27418. Sonde ccb256305 Bp *A.t.* 240030 – 240335

CCB256F GCGAGTGAAGTACTAGGTTTTGG
 CCB256R TTTTCAAAGCTTCTGTCTG

GCGAGTGAAGTACTAGTTTTGGTATTCCTTCTCGAGCTTCAATTTCTCCGTTATAGGAGATT
 CGAGAAAAGATGGAATAGGAAGACGTGTTTCCAGAACAACAAGATACGGGTTGAGAAGG
 GGAAGTTAGCAAAGTTAGACAAGATTGGAATGGGCATAGGAACATGTATTGATGTACCAG
 ATCGGCTAATGCTCCCAGGTTGATGCGATGTATTCCACCAGTTGACTGAAGACTTTATTA
 TTGGTATATC**GATCGGTTCCAGCACGAATTGAAATAGAAGCCGGTT****CGACAGGAAGCTTTT**
GAAAA

DpnII /gatc 180 25119. Sonde ccb382309 Bp *A.t.* 232301 - 232607

CCB382F AACAAAAGGATCGGAACTCG
 CCB382R CCAGTTGTACTACTCCCTTCG

AACAAAAGGATCGGAACTCGCTGATAGGAAAGGAGAGAAAAACAAGCAATGCCAAGAGC
 TCCGTCAATTCGCTGTTTCATCGATAGACGAAGCTCTCTTTATCATCTCGTGCCAGATG

CAACAAAGGATGAGTCCTTTTTCTTCTCGCGAACCACGGGAGCGCCAAGCGTCCAGAGGA
 GCAAAGCTCATTTCCTTTCAGGATCAAGCGGCGCATAAAAAGGGCTGGTCCGTCAAAA
 GTCCGGTTCCTTCGCAAACGAAGTTCAGAATCAACAAGGGTTCGTAGAACGAAGGGAGTG
TACAACTGG

DpnII /gatc 9 203

20. Sonde ccb452

276 Bp A.t. 51339 - 51614

CCB452F TTATCCTTTTGGAGCTGACG
 CCB452R TCCGGCCTCATATAAGAATG

TTATCCTTTTGGAGCTGACGTAACAACTAGGCAAGCCTCCCAACGAAGCCAACATAAAT
 CCTATCCGAATAAAAAAATAAAAGGCAGTTTCATTATGGTGGTATAACCAACCTCCTGTT
 CTGGAACCTCCAGTTCCAATCGAAGCATATAGATCCGTAATAGATTTGTATGTATAGCC
 ACTTCAGCCGTGCTCGTCTTTCTCGAAAGTATCTTTTTCTGGGAACATGGTTAACCAA
 AAATTATTATGTTTGC**GATTCTTCATCCACCAATGC**

DpnII /gatc 152

21. Sonde BNcob

223 Bp A.t. 60275 - 60498

BNC0BF CTATATCCTCCACACTTAATCAGC
 BNC0BR ATGCATATAACGGAGCAACC

CTATATCCTCCACACTTAATCAGCATTTAGTAGATTATCCAACCCCGAGCAATCTTAGTTA
 TTGGTGGGGGTTCCGGTCCGTTAGCTGGTATTTGTTTAGTCATTAGATAGTACTGGCGT
 TTTTTAGCTATGCATTACACACCTCATGTGGATTTAGCTTTCAACAGCGTAGAACACAT
 TATGAGAGATGTTGAAGGGGGCT**GGTTGCTCCGGTATATGCAT**

Keine Schnittstellen

22. Sonde matR

302 Bp A.t. 145598 - 145897

MATRF AGGGCTTGTTAAGGAAGACG
 MATRR GAGGATCCGACAGAAGTACG

AGGGCTTGTTAAGGAAGACGGCAAGGGCCGACGAAGGGGGGAAAACGAAAGGCCTTTTCTGGT
 CCCCCTGAGCCGGAGGGTGCTTGTGGGGGGGGTGTGCCACGACGAAACAAGGGAATGAAAGG
 CCGCTTTGCGTTGCATGCTCTTAACGCTCCCAACAATGATGGCTCTGTTGTCTTGGGGAGCGTTG
 AAGCTTGCTTCTTCTCCAGGGTTTTCTTGGTCATCAATACGACGACCTGTCCTTAATAGAACCGAT
 CTGACTCTCTGAACAATCGGAATTT**CGTACTTCTGTCCGGATCCTC**

ApoI r/aatty 279

BstXI ccannnnn/ntgg 159

DpnII /gatc 257 298

23. Sonde orfB/nad2286Bp *A.t.* 130040 – 130325

ORFBF GAACCAACTGCTTTACACC
 ORFBR CCTACAAGTGATCCACCTCC

GAACCAACTGCTTTACACCGGGGGAAGACCATCCAGAGCAAGGACCCCAACAGTTTGGAGATCTCTTGAGAAAAGTTTTAGCACTGGTGTATCCTATATGTATGCTAGTTTATTTCGAGTATCCCAATGGTGTAAAGGCCGTCGACTTATTGGGAAAAAGGAGGAAAATCACTTTGATCTCTTGTTCGGAGAAATAAGTGGCTCACGAGGAATGGAAAGAAACATATTATATAATATATCGAAGTCCTCTCCTTCAAATACT**GGAAGGTGGATCACTTGTAGG**

BstXI ccannnnn/ntgg 48DpnII /gatc 62 178 274**24. Sonde orfx**289 bp *A.t.* 157602 – 157890

ORFXF CTTGGTTTGACATGGTTTACG
 ORFXR GGAACAGGAACAAGAAGAAGC

CTTGGTTTGACATGGTTTACGTGTTACTGGTTCCTCGGAAGAGTTAATATCTCCATTAGCGTCACCCTTTCTTACCCTGCCTTTGACTCGTATTTTGTGTACACAATTAACGGAGGCCTTTTCGACATTTGTTGCAACGTCTTCAATAGCATGCTCTTATTTCTGCTTTTCTTTAATAAGTTATCAAATTTGGTGTCTTTT**GATCCCCAGTTGCTATGGAGAACAAGGACGAAATAC**AATCGATTCTC**CAATTAAGTGGTTCTCGCTTCTTCTTGTTCCTGTTCC**

Apol r/aatty 188BstXI ccannnnn/ntgg 252DpnII /gatc 204**25. Sonde atp6-ncrA**1021 bp nicht in *A.t.* vorhanden

Sequenzidentität zu atp6-orf263 ist kursiv dargestellt

FATP6 GGTGTAGCTATATTACAAGC
 RORF263² AGGTGATTCTGCTGTTGAGCTG

GGTGTAGCTATATTACAAGCTTATGTTTTACGATCTTAATCTGTATTTACTTGAATGATGCTATAAATCTCCATTAAAGTTCTTCTTTCTTTATTTAGATTTATAATTGAACAAAAGCAGGGATGAGAGTAGTGTTATTTAGAGCAGTTACACAGCCCTCTCCTTGCAGTCGAGTGACTTCGCCCCTGAATGTCTTAGATAGCTGTAAGTGAAAGAAGGGTACTAAGTAGCTGGGAATGCGGCTAGCTAGTACTTACTTGTGTACTCCCCAGAAGCTCCAAGCCTTAACTACAATCTTCTTCGGTGCTCTTTTTTCTTTTTAGAAAAGCTTACCGGGGCTTGAGAGTCTTTATATTTATAAATGGATACACGGGTTAGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTATTGTTTTCGTTGAGAATGAGAAGTCATAGAAAAAGGTCCTTAGTCTTAACCTGCACAGAGAAGGATTCTAAAAAGCAAAAAGCAGTGAAGTCAAATTAATTGATATGGAGTTGATTTCCGAGGGGAAAGGCCAAGTAGTCAGAAGCAGGAAGCATAGGAAGCAGCAGTAAAAGCAGTCCGAAAAGCAGTGAAGGATGGCAAGGGGAGAATAAAGCCTATGAATGAATGTTGAATGGGAAGTGGGAGCTCCTGAGTGATTCTGCTTCACTAAAGGGTCAGAACTCGATATCAGTGTTCATTGTCGCGGTCCGGG**GATCCCCGAATCATTCCAAGATTCACGTCATAGAATGAAGATGCGGGGTGATAG**TTTGACTATCTTGTCAAATCTATCTCTTGGATTTTTAACAAAGGAAAGCCCCCTACCCTAATGCCATTTGATTGATTAAAGTTCCGTGCTGAGGCGTTCCTCGGCATCGTCGTCGAGCTGCCGAGAGAGAT

CCTCTATAAGTCAGTCTCTCTACGTAACCCCAATCGGGAGTCTCAACTAACATCCATCTTACCATAC
CAATCAATTTGATAACAGCTCAACAGCAGAATCACCT

BsrBRI /gatn/nnac 33

DpnII /gatc 33 728 915

26. Sonde ncrA

595 bp nicht in *A.f.* vorhanden

Entspricht der Sonde atp6-ncrA von Base 263 – 857

FATP6NCR TGTTTGTACTCCCCAGAAGC
RATP6NCR TCAATCAAATGGCATTAGG

**TGTTTGTACTCCCCAGAAGCTCCAAGCCTTAACTACAATCTTCTTCGGTGCTCTTTTTTT
CTTTTTAGAAAGCTTACCGGGGCTTGAGAGTCTTTATATTTATAAATGGATACACGGGTT
AGACCTTCTTCTTTTCATTCTTGGTCTTATTGTTTTCGTTGAGAATGAGAAGTCATAGAA
AAAAGGTCTTAGTCCTAACTCGCACAGAGAAGGATTCTAAAAAGCAAAAAGAAGCGTGAGT
CAAATTAATTGATATGGAGTTGATTTCCGAGGGAGGGAAAGGCAAGTAGTCAGAAGCAGG
AAGCATAGGAAGCAGCAGTAAAAGCAGTCCGAAAAGCAGTGAAGGATGGCAAGGGGAGAA
TAAAGNCTATGAATGAATGTTGAATGGGAACTGGGAGCTCCTGAGTGATTCTGCTTCACT
AAAGGGTCAGAACTCGATATCAGTGTTTCATTGTCGCGGTCCGGGATCCCCCGAATCAT
TCCCAAGATNCACGTCATAGAATGAAGATGCGGGGTGATAGTTTGACTATCTTGTCAAAC
TCTATCTCTCTTGATTTTTAAACAAAGGAAAGCCCCCTACCCCTAATGCCATTGA**

DpnII /gatc 466

27. Sonde ncrB

343 bp nicht in *A.f.* vorhanden

identisch mit den ersten 343 Basen der Sonde Nr. 26

FATP6NCR TGTTTGTACTCCCCAGAAGC

**TGTTTGTACTCCCCAGAAGCTCCAAGCCTTAACTACAATCTTCTTCGGTGCTCTTTTTTT
CTTTTTAGAAAGCTTACCGGGGCTTGAGAGTCTTTATATTTATAAATGGATACACGGGTT
AGACCTTCTTCTTTTCATTCTTGGTCTTATTGTTTTCGTTGAGAATGAGAAGTCATAGAA
AAAAGGTCTTAGTCCTAACTCGCACAGAGAAGGATTCTAAAAAGCAAAAAGAAGCGTGAGT
CAAATTAATTGATATGGAGTTGATTTCCGAGGGAGGGAAAGGCAAGTAGTCAGAAGCAGG
AAGCATAGGAAGCAGCAGTAAAAGCAGTCCGAAAAGCAGTGAA**

keine Schnittstellen

28. Sonde atp6-orf263

866 Bp nicht in *A.f.* vorhanden

Sequenzidentität zu Sonde Nr.25. atp6-ncrA ist kursiv dargestellt

FATP6 GGTGTAGCTATATTACAAGC
RORF263² AGGTGATTCTGCTGTTGAGCTG

**GGTGTAGCTATATTACAAGCTTATGTTTTTACGATCTTAATCTGTATTTACTTGAATGAT
GCTATAAATCTCCATTAAAGTTCTTCTTTCTTTTATTTAGATTTATAATTGAACAAAAGC
GAGGGATGAGAGTAGTGTTATTTAGAGCAGTTACACAGCCCCCTCTCCTTTTCAGTCGAGTT
GCTAAAGCACATCTCGCAACAAGTGCTCGAGTCACTCCGAGGAACGCCTTTTCAGTCGAG**

TTGCTAAAGCACCTCTCCTTTGCTGTTTCGAGTAAACAAGAAATGCTCGAGTTACTAAATA
 CCCCTAAGGGGCCCTCTCTGATAAGGAAAAAACGAAAAATCTCAAATTTATGAAAAA
 TAGACTCCAATGGCTATTACCCCTGCTCGGTAGTTCGGTAGCAGGTTTTTTAGGACGTTT
 TCTAGGATCAGAAGGAAGCGCTATTCTGACCACTACGTGCGTTTTATTCTTCCGCACTGGT
 GGGCTTACTATTTGTATTTTCGCATTTATTACTTTCGTTTTGAAAGGACCACTGAGGGGGAT
 TCTCAATCTCTTCGTGGTCTTTTTTCATCGCCATGGTAATCTCTTTGATACGAATCAAAGT
 CATTTACCTAGTGAGTCCGGCTTTGCCCTGTTGGGGCCCTTTCTATGGTATGCTTTCTC
 GGGTTCGTCTGGGGAGATAGTGAATCACCAAACCGAGGCCTCTTCTGAAGGGTTTACGTA
 TACTTCGGACATGCTGGAAGATTTCGGCCAGTTCTGGGCGTAGCCGTCGGTCAATCGACC
 GATTCAGAGGGAACAGGCTGGGCCATCCAATGCCTTTCCCGCCCCCAACCCACCGCTGC
CCCAGCAGCTCAACAGCAGAATCACCT

Apol r/aatty 347

BsrBRI gatnn/nnatc 33 586

DpnII /gatc 33 426

29. Sonde orf263²

350 Bp nicht in *A.t.* vorhanden

Ein Fragment aus der Sequenz Nr. von Position 517 – 866

FORF263² TTTGAAAGGACCACTGAGGGGG
 RORF263² AGGTGATTCTGCTGTTGAGCTG

TTTGAAAGGACCACTGAGGGGGATTCTCAATCTCTTCGTGGTCTTTTTTCATCGCCATGGT
 AATCTCTTTGATACGAATCAAAGTCATTTACCTAGTGAGTCCGGCTTTGCCCTGTTGGG
 GCCCTTTCTATGGTATGCTTTCTCGGGTTCGTCTGGGGAGATAGTGAATCACCAAACCGA
 GGCCTCTTCTGAAGGGTTTACGTATACTTCGGACATGCTGGAAGATTTCGGCCAGTTCTGG
 GCGTAGCCGTCGGTCAATCGACCGATTTCAGAGGGAACAGGCTGGGCCATCCAATGCCTTT
 CCCGCCCCCAACCCACCGCTGCCCCAG**CAGCTCAACAGCAGAATCACCT**

BsrBRI gatnn/nnatc 70

30. atp9-Genbereich „D34atp9-2“ der CMS *Tournefortii* „Stiewe“

5' – 3' Bereich 1525 Bp

atp9 ist fett hervorgehogen, homologe Bereiche zu d34atp92 sind kursiv gedruckt

AAGCTTGAAAGACTTTAATCAAACTCATCGGGATTCAAAGATCCCTTCCTTATT
 GATACAATTAGACCCGCCGCGGTATGCTCAGCTACGCCATTGATCCTTGAGTACTTGTGC
 TAAGTACATGCTCTCTCTTTCTTTACTTATGCTTTACGCTTACAGGACTATGCTCTTC
 ATTTCTCGAGGAACGCCTTTGAATTATAGCGGAAAAGTCCCGCACTTCATTACGAAAGAC
 TGGGCCTTCTAATCCTCCAATCGTGCAGTAGCTCTCGTATATAAGAGAAGGGCAGCATT
 TAGGAGTAATCGATCTCACAACTATCAATTTTCATAAGAGAAGACGAAGACGGATCAAT
 TGAATAATCGAAGAGATATGGGACCCTAGCTACGAGTCAGTCCCTCTAACGTCGAATGAT
 CTACTTGCTTGTACTTCTTTGTGCGAGATTGAGTTGGTCTTCAGTCTACCACTCCGTGG
 GTACAAGATCGAAAAGAATGCATTCCAAGTGAGATGTCCAAGATTAAGGAACGAGGGTA
 AGAATCGACGAGGAATCAATAAGATAGAAGATCAGTGAATGACAAAGCGTGAGGAGAATT
 ATCAACCCGAG|-?|**JATGTTAGAAGGTGCAAAATCAATAGGTGCCGGAGCTGCTACAATTGCTT**
CAGCGGGAGCTGCTATCGGTATTGGAAACGCTTTCAGTTCTTTGATCCATTCTGGGGCGC
GAAATCCATCATTGGCTAAACAATCATTGGTTATGCCATTTTGGGCTTTGCTCTAACCG
 AAGCTATTGCATTGTTTGCCTCAATGATGGCCTTTTTGATCCTTATTCGTATTCTGATCGAA
 GAAAGAAGGTTTCATTCAGTCTCATAAAGCAAGCACCTTTTCACATAAGAAAGTGGAGA
 CAGGCTTGGATACGATCTAAAATGATTCCACATGAAAGAGGACCGGGCAATCGCCCTCTT
 GAGTAATGAAGAAGCGGGCTAGTCCCCGAAAATGCCCGTTAATAAAGCAAGTTGGGGAAC

AAAATCTTCCTTGTAGTTACTCATTCTTCGGTCGAGCGTTCTCCGGACGTCGAGAAAT
 CTATCACTCAATCGCTGGCCGCTCTGTCATTGTCTGATTTTAGGTTTCTGATCACACTCG
 AAATTATGTATCTACTTATCGTATTTTTACCCCTGCTCGGTAGTCCGTAGCAGGTTTTT
 TCGGACGTTTTCTAGGATCAGAAGGAAGCGCTATTCTGACCACTACGTGCGTTTTATTCT
 TCGCACTGGTGGGCTTCTATTTTTATTTGGAATTTATTACTTTTCGTTTGAAAGGACCAC
 TGAGGGAGATTCTCAATCTCTTCTTGGTCTTTTCATCGCCGGTGGTAATATCTTTGATA
 CGGATCAAAGTCATCCACCTACTGGTGGTCAGGCTTTGCCCTGTTGGAGCCCATTATAT
 GGGCTGCAGTAGGAGGGGGAGCACTTCTTTTACGGGCCCTAACGGGGCGGAGAGCTCAT
 CCACGTGGGAAGGAGGATCTCTTGGCTCG

ApoI r/aatty 1287

BsrBRI gatnn/nnatc 1373

DpnII /gatc 41 97 307 348 413 482 565 699 813 830 910 1126 1212 1379 1512

HindIII a/agctt 1

31. Sonde 5'atp9-2

191 Bp

D34SONDEATP9F5' CTCAGCTACGCCATTGATCC
 D34SONDEATP9R5' GAGAGCTACTGCACGATTGG

CTCAGCTACGCCATTGATCCTTGAGTACTTGTGCTAAGTACATGCTCTCTCTTTCTTT
 ACTTATGCTTTACGCTTACAGGACTATGCTCTTCATTTCTCGAGGAACGCCTTTGAATTA
 TAGCGGAAAAGTCCCGCACTTCATTACGAAAGACTGGGCCTTCTTAATCCT**CCAATCGTG**
CAGTAGCTCTC

DpnII /gatc 16

32. atp9-Genbereich „D34atp9-2a“ der CMS *Tournefortii* „Stiewe“

5'- 3' Bereich 1819 Bp

atp9 ist fett hervorgehoben, homologe Bereiche zu atp9 sind kursiv gedruckt

GGACTGAAAGGGAGAGGGCGTTCCTCGGTTGCGGGGTTGAGGGTGCAGGTTGCGGCTAAATCCAATG
 GGGTTGGCGGAGTTGGTAGGCGTTCCTCGGTGGGCACAGTTCTGTAAATAAGAGATGTCTCATC
 CGGGTTGAGCTGTGCAATCAGTCTTTCTCTTCTGTTGGTAGCAGAACGAATAGGAGATCCAACA
 TGACTGTATTAAGCCTGTGCAATCAGGGTTAAGCTAGCTCATTGCCAGAAAGCAAACAGGAGCT
 CTTATTTAGATCAGAGGACGCTCATCCCAGGTGCTTTAGCAACTCGACTGAAAAGGAGAGG
 TATTTCTTACTCGAGCACTTGTCTAGAGAGGAACGAGAGTATTTCTAAAAGGAGAGAGGG
 CGTAAGCATGATTCCGGGGCGGAGCCATATGACGCGAGAGTGTAGACTCTGGAACCTCAGG
 GAGCAAGACCCTAAAGAAAGTTCAAGAAGCTATGAAGAGTGGTAAACTCTAAAAGGAAAG
 ATGGAAACTGGGGAGTTGGCTGATAAAGATGGACAGTAACGATTGCGAAGACATCCGAAT
 CTACTTTTTTCCAGTTCCTACTAATTCTGCAAACGACATTCTGACAGGAGTCCCACCTTCG
 GATATATTACCAAATATATCAGAAGTGGACGTAATAAAGGATCCTTTGACTGTTGAGGT
 ACGGTCGCTCTAAAAGAGGAATTAGTGGATAATCCCATTTATGGAGAGTTAACCCTGGTTGAAT
 CACTTCTTAGTGAATCAGCAGTATGACTTTTATGGTGGGATCATACAGTCCCCGTATATTGAGAC
 CTGCAGCGAGAATTGGACCACACTCCTGCAGAACTCCTCAGCGATAAGCTGAACTTTCTTTATTT
 CGCGAAATCCTCGATTTAAAAGTTCGAGTGAATGAGTGGTATATGCAGAAATTTAGGGGTTCTGG
 CCTGAAAATTTTATTCAAGAATATGAAGAAAATGTTACTCTAACTATGTTAGAGTGATGGAAATC
 CCCACACCCTGGAAGCATGGGATTTTACATTTTCTTACTATTACTAGTATCGGTATTTT
 CTTACTATTCTATTCTGTTGGATGAAAAGAAATAAGTCCGACAAAGG
ATGTTAGAAGGTGCAAAATCAATAGGTGCCGGAGCTGCTACAATTGCTTCAGCGGGAGCTGCT
ATCGGTATTGAAACGTCTTCAGTTCTTTGATCCATTCTGTGGCGCGAAATCCATCATTGGCTAA
ACAAATCATTGGTTATGCCATTTGGGCTTTGCTCTAACCGAAGCTATTGCATTGTTGCC

AATGATGGCCTTTTTGATCTTATTCGTATTCT

GATCGAAGAAAGAAGGTTTCATTTCAGTCTCATAAAGCAAGCACCTCTTTCACATAAGAAAGTGGA
 GGCAGGCTTGGATACGATCTAAAATGATTCCACATGAAAGAGGACCGGGCAATCGCCCTTGA
 GTAATGAAGAAGCGGGCTAGTCCCCGAAATGCCCGTTAATCAAAAAGGTGGGGACAAAATTTTCC
 TTATAATCAAATAAGGCTTCAGCGTTGTAACAAGCCTTCTGAGCCAGGATCAAACCTCTTCTTTGA
 CTATGATTGGGCCCTGCAGTGGTAGAACCTCGTGAACCGGGCGTACTTACTTCCCAACCTTCTGT
 GGACCTTTCTTCTCTATATAACTTAAATGAGAATCTTCTTCTCTATCTTTTTAACTGGAATGA
 GATTTTTATTCTCTTACGATATTTGAAATGCAATTGGGCTTCTCTATATTTTATAGAGTT
 TCGTTTCTTTTATCTATCTCCCCATTCCAACG

ApoI r/aatty 921 945 1525

BamHI g/gatcc 654

BsrBRI gatnn/nnatc 996

BstXI ccannnnn/ntgg 710 1007

DpnII gatc 181 263 655 780 1209 1323 1340 1420 1581

33. Sonde 5'atp9-2a

124 Bp

F5'D34SONDEATP9 ACCTTTGTTACTGTTTCAGGTACGG
 R5'D34SONDEATP9 TCCCACCATAAAAAGTCATACTGC

CCTTTGTTACTGTTTCAGGTACGGTCGCTCTAAAAGAGGAATTAGTGGATAATCCATTATT
ATGGAGAGTTTAACCCGTTGAATCACTTCTTAGTGAATCAGCAGTATGACTTTTATGGT
GGGA

BstXI ccannnnn/ntgg 53

34. Translation des 5'-Bereichs von atp9-2a der CMS *Tournefortii* "Stiewe"

Der Bereich des atp9 ist unterstrichen, die Übereinstimmung mit atp6 ist fett gedruckt
 267 Aminosäuren inklusive atp9, sonst 193 Aminosäuren

MRRHPNLLFSSSTNSANDILTGVPPLRDILPNISEVDVIKDPLYCSGTVALKEELVDNPIIMESLTRLNHF
 LVNQYDFYGGIIQSPYIRDLQRELDHTPAELLSDKLNFLYFREILDKTRVNEWYMQNLGVPGENF
 IQEYEEKCYSNYVRVMEIPTPLEAWDFTFFFITSIGIFLLFLFCWMKRNKSDKGMLEGAKSIGAGAATI
ASAGAAIGIGNVFSSLIHSVARNP SLAKQSFGYAILGFALTEAIALFAPMMAFLILFVF

35. Vektorsequenz pGemT

T7-PRIMER TTAATACGACTCACTATAGG
 SP6-PRIMER TACGATTTAGGTGACACTATAG

<http://www.promega.com/vectors/pgemt.txt> (2002)

7.3 Genbankeinträge

- (1) gi|13449290
- (2) gi|458796|emb|X68727
- (3) gi|257561|gb|S47089.1|
- (4) gi|257558|gb|S46795.1|
- (5) gi|11248|emb|X58277.1
- (6) gi|11246|emb|X58276.1
- (7) gi|294499|gb|M24672.1
- (8) gi|303514|dbj|D13696.1
- (9) gi|11252|emb|X69320.1
- (10) gi|1419384|emb|X98798.1
- (11) gi|1785729|emb|Y08502.1
- (12) gi|1785673|emb|Y08501.1
- (13) gi|1785729|emb|Y08502.1
- (14) gi|1524184|emb|X63653.1
- (15) gi|633155|emb|X83692.1
- (16) gi|2724122|gb|AF037264.1
- (17) gi|2707740|gb|AF036383.1
- (18) gi|2689076|gb|AF036385.1
- (19) gi|2689075|gb|AF036384.1
- (20) gi|2687654|gb|AF036387.1
- (21) gi|1419615|emb|X98300.1
- (22) gi|303514|dbj|D13696.1
- (23) gi|1524181|emb|X63654.1
- (24) gi|3342501|gb|AF076166.1
- (25) gi|1785673|emb|Y08501.1
- (26) gi|13449387|ref|NP_085569.1
- (27) gi|303515|dbj|BAA02855.1
- (28) gi|9049295|dbj|BAA99305.1

7.4 Ergebnisse der Southernblothybridisierungen

Sonde	Verdau	<i>A. thaliana</i> C24 [kB]	<i>B. tournefortii</i> [kB]	„DH1“ [kB]	„D34-2“ [kB]	„A2“ [kB]	„A102“ [kB]	<i>B. oleracea</i> [kB]	„A32“ [kB]
atp1	DpnII	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54
	ApoI	1,5	1,5	1,5	1,5		1,5	1,5	1,5
	EcoRI	11/(5,5)	9,6	4,8	4,8	4,8	9,6	4,8	4,2
	BsrBRI	22	17	17	22	17	19	17	13
	BstXI	12	16	20	20	20	16	20	16/(9,8)
atp6	DpnII	0,90/(0,37)	1,0	1,2	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0
	ApoI	3,5/1,3	1,0	6,8	1,0	6,8	1,0	6,8	3,8
	EcoRI	4,3/1,6	6,1	8,6	4,3	8,6	6,1	8,6	7,5
	BsrBRI	2,3	4,1	5,6	5,6	5,6	4,1	5,6	4,1
	BstXI	5,7	12	5,6	10	5,6	12	5,6	1,3
atp9	DpnII	0,36/0,3	0,47	0,27	0,47	0,27	0,47	0,27	0,47
	ApoI	2,2/1,2	1,1/0,69	(1,4)/1,1	1,1/0,7	1,4	1,1/0,7	1,6/(2,7)	2,0/0,7
	EcoRI	18/(10)/4,7	8,2/(5,1/5,0)/3,8	2,6	8,2/(5,1/5,0)/3,8	2,9	(8,2)/5,1/5,0/(3,8)	12	4,0/3,2
	BsrBRI	9,7/3,6	4,4/2,5	3,0	4,4/2,5	3,0	4,4/2,5	9	(10)/3,0
	BstXI	4,6/4,2	19/4,6	20	19/4,6/(4,1)	20	19/(4,6)/4,1	19	19/14
cox1	DpnII	0,74/0,38	0,53/0,38	0,53/0,38	0,53/0,38	0,53/0,38	0,53/0,38	0,53/0,38	0,53/0,38
	ApoI	-	1,2	0,65	(1,2)/0,9	0,65	(1,2)/0,9	0,65	0,65
	EcoRI	4,3	18	14(7,3/4,3)	14/(8,5/4,8)	14(8,5/5)	14	14	11
	BsrBRI	4,2	16	14	11	11	(16)/11	14	-
	BstXI	7,3	13	13	13	13	13	13	11/(2,2)
cox2	DpnII	0,7	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
	ApoI	2,3	2,7	2,7/2,4	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
	EcoRI	(4,3)/3,0	4,9	4,9/4,6/3,5/3,2	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
	BsrBRI	7,8	19	19/17/13/8,8	19	19	19	19	19
	BstXI	15	3,5	15/3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
cox3	DpnII	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	ApoI	2,9	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	EcoRI	11	17	17	17	17	17	17	15
	BsrBRI	16/9,5	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
	BstXI	4,3	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6

7. Anhang

Sonde	Verdau	<i>A. thaliana</i> C24 [kB]	<i>B. tournefortii</i> [kB]	„DH1“ [kB]	„D34-2“ [kB]	„A2“ [kB]	„A102“ [kB]	<i>B. oleracea</i> [kB]	„A32“ [kB]
nad1	DpnII	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
	ApoI	(4,9)/1,8	(12/2,9)/1,7	(11)/1,7	(12)/1,7	(11)/1,7	(11/4,4)/1,7	(11)/1,5	(10)/1,7
	EcoRI	17/15/(3,1)	(16,7)/8,3	(16,7)/13/(3,1)	(16,7)/13/(3,1)	(16,7)/13/(3,1)	(16,7)/8,3	(16,7)/4,0	(14)/8,3/(3,1)
	BsrBRI	19/(14)	8	10/(8)	10/(8)	10/(8)	8	3,1	8
	BstXI	13/2,4	19/2,4	21/2,4	19/2,4	21/2,4	19/2,4	19/2,6	16/2,3
nad2	DpnII	0,53/0,47/0,42	1,0/0,61/0,55/0,47/0,42	1,0/0,42	1,0/0,61/0,47/0,42	1,0/0,55/0,42	1,0/0,61/0,55/0,47/0,42	1,0/0,55/0,42	1,0/0,58/0,42
	ApoI	3,5/1,1	1,4/1,0/0,89	1,2/1,1/1,0	1,0/0,89	1,1/1,0	1,4/1,0/0,89	1,1/1,0	1,9/1,5/1,0
	EcoRI	11/6,6/4,4/4,1/2,9	9,9/7,7/3,8/1,4/0,95	4,1/3,2/1,3/1,2	7,1/3,8/0,95	9,5/4,0/3,2/1,4/0,95	9,9/4,9/3,8/1,4/0,95	4,0/1,1	9,9/6,6/4,0/1,6/1,2
	BsrBRI	11/2,3	17/4,8/4,4/3,2	2,9/2,7	4,6/4,4/3,2	17/6,9/2,9/2,7	19/11/4,9/4,4/3,2	2,7	17/13
	BstXI	17/7,0/	19/8,0/7,0	22/20/17	19/12/11/4,6	21/17	19/17/12	21/2,9	19/18/2,3
nad3	DpnII	-	-	-	-	-	-	-	-
	ApoI	0,71	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	EcoRI	2,3	2,6	2,6	2,6	2,9	2,6	2,6	13
	BsrBRI	6,0/2,4	15	4,8/1,9	13	4,8/1,9	15	4,8/1,9	10
	BstXI	4,3	19	20	19	20	19	19	19
nad4	DpnII	0,55/0,34	0,55/0,34	0,55/0,34	0,55/0,34	0,55/0,34	0,55/0,34	0,55/0,34	0,55/0,34
	ApoI	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
	EcoRI	13/1,1	8,2/1,2	8,2/1,2	8,2/1,2	8,2/1,2	8,2/1,2	8,2/1,2	8,2/1,2
	BsrBRI	1,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
	BstXI	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
nad4l	DpnII	0,67	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
	ApoI	-	-	-	-	-	-	-	-
	EcoRI	8,1/0,95/0,71	2,7/0,89	14/0,89/0,68	2,7/0,89/0,68	2,7/0,89/0,68	2,7/0,89	14/0,89	4,0/0,89/0,68
	BsrBRI	12/2,0	5,2/(2,4)	15	5,2/(2,4)	(16)/7,2	(15)/5,2/(2,4)	(14)	1,9
	BstXI	15	12	11	9	15	12	11	13
nad5	DpnII	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	ApoI	2,4	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
	EcoRI	7,6	14	14	14	14	14	14	10/6,1
	BsrBRI	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
	BstXI	19	11	11	11	11	11	11	11
nad6	DpnII	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
	ApoI	1,5	0,9	1,6/0,9	1,6/0,9	4,4/1,6	1,6/0,9	4,4/1,6	0,9/0,7
	EcoRI	19/4,2	19/(11)	(19)/11	(19)/11	(19)/11	(19)/11	(19)/11	(19)/11
	BsrBRI	8,3/2,9	(20)/15	17	20/(15)	17	20/(15)	17	17
	BstXI	6,3	18	18	18	18	18	18	18

7. Anhang

Sonde	Verdau	<i>A. thaliana</i> C24 [kB]	<i>B. tournefortii</i> [kB]	„DH1“ [kB]	„D34-2“ [kB]	„A2“ [kB]	„A102“ [kB]	<i>B. oleracea</i> [kB]	„A32“ [kB]
nad7	DpnII	0,71	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73
	ApoI	3,6/1,5	3,6/1,6	3,6/1,6	3,6/1,6	3,6/1,6	3,6/1,6	3,6/1,6	3,6/1,6
	EcoRI	14	4,6/1,6	4,6/1,6	4,6/1,6	4,6/1,6	4,6/1,6	4,6/1,6	4,6/1,6
	BsrBRI	19	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2
	BstXI	6,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
nad9	DpnII	0,52/0,39	0,52/0,39	0,52/0,39	0,52/0,39	0,52/0,39	0,52/0,39	0,52/0,39	0,52/0,39
	ApoI	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
	EcoRI	7,5	14	14	14	14	14	14	14
	BsrBRI	3,4	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
	BstXI	19	12	12	12	12	12	12	12
ccb203	DpnII	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
	ApoI	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	EcoRI	3,0/(2,1)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	BsrBRI	10	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
	BstXI	6,0	9,6	6,0	9,6	6,0	9,6	6,0	8,9
ccb206	DpnII	1,1	1,5	1,1	1,5	1,1	1,5	1,1	1,5
	ApoI	3,2	2,6	2,5	2,6	2,5	2,6	2,5	2,7
	EcoRI	18	4,1	2,7	4,1	2,7	4,1	2,7	5,0
	BsrBRI	4,6/4,1/3,8/3,1	3,5/2,7/1,0	4,8/3,2	3,5/2,7/1,0	4,9/3,2	3,5/2,7/1,0	4,9/3,2	3,5
	BstXI	20	18	22	18	22	18	22	22
ccb256	DpnII	0,47	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
	ApoI	2,7	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	EcoRI	4,2	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,4
	BsrBRI	3,4	4,0	(14)/11	4,0	(14)/11	(11)/4,0	-	-
	BstXI	21	19	16	19	16	19	16	22
ccb382	DpnII	0,56	0,42/0,37	0,42/0,37	0,42/0,37	0,42/0,37	0,42/0,37	0,42/0,37	0,42/0,37
	ApoI	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57
	EcoRI	4,8	17/(12)	17/(12)	17/(12)	17/(12)	17/(12)	17/(12)	17
	BsrBRI	11	4,2	4,5	4,2	4,5	4,2	4,5	4,5
	BstXI	17	19	17	18	17	17	17	19
ccb452	DpnII	0,6/0,39	0,6/0,39	0,6/0,39	0,6/0,39	0,6/0,39	0,6/0,39	0,6/0,39	0,6/0,39
	ApoI	1,3	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
	EcoRI	4,5	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
	BsrBRI	17	19	19/18	19	19/18	19	-	19
	BstXI	8,1	11	11	11	11	11	11	11

7. Anhang

Sonde	Verdau	<i>A. thaliana</i> C24 [kB]	<i>B. tournefortii</i> [kB]	„DH1“ [kB]	„D34-2“ [kB]	„A2“ [kB]	„A102“ [kB]	<i>B. oleracea</i> [kB]	„A32“ [kB]
matR	DpnII	(1,3)/0,81	(1,3)/0,81	(1,3)/0,81	(1,3)/0,81	(1,3)/0,81	(1,3)/0,81	(1,3)/0,81	(1,3)/0,81
	ApoI	2,2	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
	EcoRI	(4,5)/0,61	3,7/0,61	3,7/0,61	3,7/0,61	3,7/0,61	3,7/0,61	3,7/0,61	3,7/0,61
	BsrBRI	19	(19)/8,8	9,4	9,4	(16/14)/9,4	(19/13)/8,8	3,3	8,8
	BstXI	(7,2)/3,3/2,4	(11)/6,5/2,4	16/(11)/2,4	(11)/6,5/2,4	15/(11)/2,4	(11)/6,5/2,4	(19/11)/2,4	(11)/7,9/2,4
cob	DpnII	1,1/0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
	ApoI	2,0	-	-	-	-	-	-	-
	EcoRI	12/1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
	BsrBRI	7,3/5,9,4	20	20/13	20	20/13	20	20/13	20
	BstXI	13/4,0	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
orfX	DpnII	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
	ApoI	-	-	-	-	-	-	-	-
	EcoRI	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7
	BsrBRI	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
	BstXI	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
ncrB	DpnII	-	1,0/(0,49)	0,71	1,0/(0,49)	0,71	1,0/(0,49)	0,71/(0,6)	1,0
	ApoI	-	4,6	6,8	4,7	6,8/(3,6)	4,7	6,8	3,7
	EcoRI	-	4,6	8,6	4,6	8,6	4,6	8,6	4,6
	BsrBRI	-	4,4	1,5	4,4	1,5	4,4	1,5	4,4
	BstXI	-	8,6	5,6	8,6	5,6	8,6	5,6	7,4
orf263²	DpnII	0,47/0,36	0,47/0,27	0,31/0,27	0,47/0,27	0,31/0,27	0,47/0,27	0,31/0,27	0,27
	ApoI	(2,2)/1,1	0,82/0,67	0,9/0,74	0,83/0,74	1,0/0,7	0,83/0,74	0,9/0,68	1,8/0,83
	EcoRI	(18)/4,4	6,1/2,6	3,4/2,6	4,3/2,6	3,4/2,9	6,1/2,6	4,1/2,6	7,5/4,0
	BsrBRI	(17/9,7)	15/5,9/0,56	3,1/3,0	13/2,5/0,56	3,1/3,0	16/5,9/0,56	3,0	-
	BstXI	(4,6/4,2)	12	(20)/17	(20)/14	(20)/17	20/14	20/3,0	20/3,0

7.5 Ergebnisse der Northernhybridisierungen

Sonde	<i>A. thaliana</i> C24 [kB]	<i>B. tournefortii</i> [kb]	„DH1“ [kB]	„D34-2“ [kB]	„D34-RF“ [kB]	„D34-RS“ [kB]	„A2“ [kB]	„A102“ [kB]	„A32“ [kB]
atp1	2,56/2,08/1,73	1,82	1,82	1,82	-	-	1,82/2,63	1,82/2,56	1,82/2,31
atp6	(6,2/4,19/3,68/2,25)/1,27/0,79/0,48	0,88/(0,6)/0,48	(1,97/1,87)/0,88/0,48	(3,32/2,31/1,87/1,48)/0,88/0,48	(3,32/2,31/1,87)/0,88/0,48	(3,32/2,31/1,87/1,48)/0,88/0,48	(1,97/1,87)/0,88/0,48	(2,84)/2,31(1,48)/0,88/0,48	(3,07/2,7/2,63)/0,88/0,48
atp9	4,14/(2,48)/1,68/1,48/0,53	(1,58)/0,53	0,53	1,58/(1,28/1,17)/1,1/1,0(0,66)/0,53	(1,58/0,66)/0,53	1,58/(1,28/1,17)/1,1/1,0(0,66)/0,53	0,53	1,58/(1,28/1,17)/1,1/1,0(0,66)/0,53	2,71/(2,41/2,2/1,95/1,58/1,28/1,17/1,1/0,66)/0,53
cox1	1,87/1,64/1,30/0,5	(2,7/2,31)/1,87/0,5	3,98/2,7/2,31/1,87	(3,98/2,7/2,31)/1,87	-	-	(3,98)/3,32/(2,7/2,31)1,87	(3,98)/3,32/(2,7/2,31)1,87/1,52	1,92/1,78
cox2	2,59/(1,63/1,55/1,47)1,16/1,11	(1,47)/1,16/1,11	(2,59/1,95)/1,47/1,16/1,11	(2,59/1,95)/1,47/1,16/1,11	-	-	(2,59/1,95)/1,47/1,16/1,11	(2,59/1,95)/1,47/1,16/1,11	(2,59/1,95)/1,47/1,16/1,11
cox3	1,64/1,60/1,51/1,43	1,99/1,64/1,55/1,47/1,18/1,03	1,99/1,64/1,55/1,47/1,18/1,03	1,99/1,64/1,55/1,47/1,18/1,03	1,99/1,64/1,55/1,47/1,18/1,03	1,99/1,64/1,55/1,47/1,18/1,03	1,99/1,64/1,55/1,47/1,18/1,03	1,99/1,64/1,55/1,47/1,18/1,03	1,99/1,64/1,55/1,47/1,18/1,03
nad1	5,19/4,79/3,07/1,63/1,26/1,13/0,78/0,67	3,07/1,96/1,05/0,78/0,67	(7,3/6,23/4,55)/4,1/3,59/3,07/1,96/1,68/1,05/0,78/0,67	(7,3/6,23/4,55)/4,1/3,59/3,07/1,96/1,59/1,05/0,78/0,67	-	-	(7,3/6,23/4,55)/4,1/3,59/3,07/1,96/1,68/1,05/0,78/0,67	(7,3/6,23/4,55)/4,1/3,59/3,07/1,96/1,59/1,05/0,78/0,67	(7,3/6,23/4,55)/4,1/3,59/3,07/1,96/1,59/1,05/0,78/0,67
nad2	6,76/5,94/4,95/3,81/3,18/2,86/2,58/2,27/1,46/0,74/0,67	1,15/0,74/0,67	6,76/5,94/4,95/3,91/3,62/3,18/2,86/0,99/0,74/0,67	6,76/5,94/4,95/4,12/3,62/3,18/2,86/2,15/1,15/0,74/0,67	6,76/5,94/4,95/4,12/3,62/3,18/2,86/2,15/1,15/0,74/0,67	6,76/5,94/4,95/4,12/3,62/3,18/2,86/2,15/1,15/0,74/0,67	6,76/5,94/4,95/3,91/3,62/3,18/2,86/0,99/0,74/0,67	6,76/5,94/4,95/4,12/3,62/3,18/2,86/2,15/1,15/0,74/0,67	6,76/5,94/4,95/2,58/2,27/1,31/1,15/0,94/0,74/0,67
nad3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nad4	(5,54/4,77/4,35)/3,42/(3,12/2,69/2,38)/1,66/0,93/0,73/0,69	1,66/(1,34/1,19/1,12/0,93/0,73/0,69)	(7,72/6,44/5,54)/3,42/(2,38)/1,66/(1,19/1,12/0,93)	(7,72/6,44/5,54)/3,42/(2,38)/1,66/(1,19/1,12/0,93)	(7,72/6,44/5,54)/3,42/(2,38)/1,66/(1,19/1,12/0,93)	(7,72/6,44/5,54)/3,42/(2,38)/1,66/(1,19/1,12/0,93)	(7,72/6,44/5,54)/3,42/2,85/(2,38)/1,66/1,23(0,93/0,69)	(7,72/6,44/5,54)/3,42/2,85/(2,38)/1,66/1,23(0,69)	(7,72/6,44/5,54)/3,42/2,85/(2,38)/1,66/1,23(0,69)
nad4l	1,90/1,54/(0,65/0,49)	1,90/1,54/(0,65/0,49)	1,90/1,54/(0,65/0,49)	1,90/1,54/(0,65/0,49)	1,90/1,54/(0,65/0,49)	1,90/1,54/(0,65/0,49)	1,90/1,54/(0,65/0,49)	1,90/1,54/(0,65/0,49)	1,90/1,54/(0,65/0,49)
nad5	6,21/4,80/4,16/3,79/3,14/2,43/1,32/0,93/0,8/0,67/0,58/0,48/0,35	3,14/2,43/2,26/2,01/1,32/1,14/1,04/0,93/0,79	6,21/5,15/4,58/4,16/3,97/3,53/3,14/2,43/2,26/1,32/1,14/1,04/0,93/0,79	6,21/5,15/4,58/4,16/3,97/3,53/3,14/2,43/2,26/1,32/1,14/1,04/0,93/0,79	6,21/5,15/4,58/4,16/3,97/3,53/3,14/2,43/2,26/1,32/1,14/1,04/0,93/0,79	6,21/5,15/4,58/4,16/3,97/3,53/3,14/2,43/2,26/1,32/1,14/1,04/0,93/0,79	6,21/5,15/4,58/4,16/3,97/3,53/3,14/2,43/2,26/1,92/1,71/1,35/1,2/1,07/0,93/0,79	6,21/5,15/4,58/4,26/3,53/3,14/2,43/2,26/1,92/1,71/1,35/1,2/1,07/0,93/0,79	6,21/5,15/4,58/4,26/3,53/3,14/2,43/2,26/1,92/1,71/1,35/1,2/1,07/0,93/0,79
nad7	6,61/5,73/4,84/3,90/3,07/2,66/2,36/2,15/1,53/1,33/1,27	(2,66/2,15)/1,53/(1,33/1,27)	(3,90/3,55/2,79/2,15)/1,53/(1,33/1,27)	(2,79/2,15)/1,53/(1,33/1,27)	-	-	(2,79/1,86)/1,53/(1,33/1,27)	(6,61/2,79/1,86)/1,53/(1,33/1,27)	(2,79/1,86)/1,53/(1,33/1,27)
nad9	6,2/5,59/3,89/2,71/2,33/1,94/1,80/1,54/1,39/1,22/1,07/0,92/0,77/0,67/0,53	(1,50/1,16)/0,94/0,9/0,71/(0,67/0,53)	(4,43/3,34/3,09/1,8/1,5/1,16/1,07/0,94/0,9/0,71/0,67/0,53)	(4,43/3,34/3,09/1,8/1,5/1,16/0,94/0,9/0,71/0,67/0,53)	(4,43/3,34/3,09/1,8/1,5/1,16/0,94/0,9/0,71/0,67/0,53)	(4,43/3,34/3,09/1,8/1,5/1,16/0,94/0,9/0,71/0,67/0,53)	(4,43/3,34/3,09/1,8/1,5/1,16/0,94/0,9/0,71/0,67/0,53)	(4,43/3,34/3,09/1,8/1,5/1,16/1,07/0,94/0,9/0,71/0,67/0,53)	(4,43/3,34/3,09/1,8/1,5/1,16/1,07/0,94/0,9/0,71/0,67/0,53)

7. Anhang

Sonde	<i>A. thaliana</i> C24 [kB]	<i>B. tournefortii</i> [kb]	„DH1“ [kB]	„D34-2“ [kB]	„D34-RF“ [kB]	„D34-RS“ [kB]	„A2“ [kB]	„A102“ [kB]	„A32“ [kB]
ccb203	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ccb206	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ccb256	1,04/(0,71/0,63)	1,51/(1,12)/0,84/(0,71)	1,51/(1,12/0,71)	1,51/(1,12/0,71)	-	-	1,51/(1,12)0,99/(0,71/0,66)	1,51/(1,12)0,99/(0,71/0,66)	1,51/(1,12)0,99/(0,71/0,66)
ccb382	(4,36/3,45/2,46)/1,75/(1,58/1,25/1,16)	1,85/(1,16)	(2,0)/1,85/(1,58/1,42/1,16)	(2,94/2,88/2,84)/1,85/(1,58/1,42/1,16)	(2,94/2,88/2,84)/1,85/(1,58/1,42/1,16)	(2,94/2,88/2,84)/1,85/(1,58/1,42/1,16)	(2,0)/1,85/(1,58/1,42/1,16)	(2,94/2,88/2,84)/1,85/(1,58/1,42/1,16)	1,85/(1,58/1,42)
ccb452	(2,56)/1,52/1,41/(0,72/0,62)	(2,56)/1,52/1,41/(0,84/0,72)	(2,56)/1,52/1,41/(0,84/0,72)	(2,56)/1,52/1,41/(0,84/0,72)	-	-	(2,56)/1,52/1,41/(0,84/0,72)	(2,56)/1,52/1,41/(0,84/0,72)	(2,56)/1,52/1,41/(0,84/0,72)
cob	4,38(3,8/3,45/1,53/1,17)	(1,85/1,17)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/4,38/4,08/3,8/3,45/2,99/2,59/1,94/1,85/1,53/1,36)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/4,38/4,08/3,8/3,45/2,99/2,59/1,94)/1,85/1,53/(1,36)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/4,38/4,08/3,8/3,45/2,99/2,59/1,94)/1,85/1,53/(1,36)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/4,38/4,08/3,8/3,45/2,99/2,59/1,94)/1,85/1,53/(1,36)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/3,8/3,45/3,06/2,41/2,19/1,94)/1,85/1,36/1,26)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/3,8/3,45/3,06/2,41/2,19/1,94)/1,85/1,53/(1,36/1,26)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/3,8/3,45/3,06/2,41/2,19/1,94)/1,85/1,36/1,26)
matR	(5,11/4,85/4,04/3,83/3,11/2,73)/1,53	(4,6/4,04)/1,53	(6,31/7,39/4,6/4,04)/1,53	(6,31/7,39/4,6/4,04)/1,53	-	-	(6,31/7,39/4,6/4,04/1,89)/1,53	(6,31/7,39/4,6/4,04/1,89)/1,53	(6,31/7,39/4,6/4,04/1,89)/1,53
orfx	2,19/(1,52)	(2,19/1,52)	2,19/(1,52)	(3,47/3,17/2,19/1,52)	-	-	2,19/(1,52)	(3,47/3,17/2,19/1,52)	2,19/(1,52)
rpl5	4,38/(2,86/2,27/1,71/1,58)	-	7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/4,38/(2,27)	7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/4,38/(2,27)	7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/4,38/(2,27)	7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/4,38/(2,27)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/(2,27)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/(2,27)	(7,61/6,43/5,06/4,71/4,6/(2,27)
rps3	6,16/5,57/4,11/2,27	-	7,61/6,43/4,38/2,27	7,61/6,43/4,38/2,27	7,61/6,43/4,38/2,27	7,61/6,43/4,38/2,27	7,61/6,43/4,38/2,27	7,61/6,43/4,38/2,27	7,61/6,43/4,38/2,27

7.6 Abkürzungsverzeichnis

Kurzbezeichnung mitochondrial kodierter Gene:

atp1, 6, 9	mitochondrial kodierte Untereinheiten der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
ccb	mitochondrial kodierte Gene der Cytochrom c Biogenese
cox1, 2, 3	mitochondrial kodierte Untereinheiten der Cytochromoxidase
cob	Apocytochrom b
nad1-9	mitochondrial kodierte Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase
rpl	Ribosomale Proteine der grossen mitochondrialen Untereinheit
rps	Ribosomale Proteine der kleinen mitochondrialen Untereinheit

Allgemeine Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AFLP	Amplifizierter-Fragment-Längenpolymorphismus
ALB	auf Adapterligation basierend
<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BC _n	n-te-Rückkreuzungsgeneration
Bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
CDP	Chemilumineszenzsubstrat (Phenylphosphat substituiertes 1,2 Dioxetane)
C/I	Chloroform/Isoamylalkohol
CMS	Cytoplasmatische Männliche Sterilität
dd	doppelt destilliert
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
dTTP	Desoxythmidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
Dig.	Digoxigenin
<i>et al.</i>	und Mitautoren
EtBR	Ethidiumbromid
Gbe.	Genbankeintrag
h	Stunde
ha	Hektar
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L.	Linné
M	molar
mL	Milliliter
μ	Mikro-
min	Minute
mt	mitochondrial/-e/-es
ng	Nanogramm
O.D.	optische Dichte
Orf, orf	offenes Leseraster
<i>p.a.</i>	<i>pro analysii</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pg	Picogramm
pmol	Picomol
RAPD	Zufällig aplifizierte polymorphe DNA
<i>Rf/rf</i>	Restorerene dominant/rezessiv
RF	restaurierte fertile Linie
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RS	nichtresttaurierte sterile Linie
Rt	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
S.	Seite
sec	Sekunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Einheiten
UV	ultraviolett
V	Volt

Lebenslauf

Jens-Holger Dieterich

Geboren am 01.07.1967 in Rotenburg (Wümme)

Schulische Ausbildung

- 1974-1978 Stadtschule Rotenburg (Wümme)
- 1978-1987 Ratsgymnasium Rotenburg (Wümme) mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

- 1987-1989 Niedersächsisches Landeskrankenhaus für Lungenheilkunde Unterstedt

Berufliche Ausbildung

- 1990-1992 Ausbildung zum Medizinisch-Technischen-Assistenten (MTLA) an der Lehranstalt für Technische Assistenten in der Medizin am AK. Hamburg-Sankt Georg

Berufliche Tätigkeit

- 1992-1993 MTLA in der Fettstoffwechselabteilung an der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf

Hochschulausbildung

- 1993-1995 Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz mit Abschluss des Vordiploms in Botanik, Zoologie, Chemie, Physik
- 1995-1996 Studium der Biologie an der Universität Oulu/ Finnland, in den Fächern Populationsgenetik, Zytogenetik, Molekularbiologie, Ökologie, Botanik
- 1996-1999 Studium der Biologie an der Universität Hannover mit Abschluss als Diplombiologe, Schwerpunkte: Genetik, Botanik, Phytopathologie
- 1999-2002 Doktorarbeit in der Abteilung Angewandte Genetik, Professor Schmitz, an der Universität Hannover.

Veröffentlichungen

- Dieterich JH, Mihr C, Braun HP, Schmitz UK; (2002). Molekulare Charakterisierung pollensteriler Cytoplasmen bei *Brassica*.
Vorträge für Pflanzenzüchtung, **54**, 441-444
- Mihr C, Baumgärtner M, Dieterich JH, Schmitz UK, Braun HP; (2001). Proteomic approach for investigation of cytoplasmic male sterility (CMS) in *Brassica*.
Journal of Plant Physiology, **158**, 787-794
- Karhu A, Dieterich JH, Savolainen O; (2000). Rapid Expansion of Microsatellite Sequences in Pines.
Journal of Molecular Biology and Evolution, **17**(2), 259-265
- Greve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H. und Windler E; (1993). Apolipoprotein B mRNA Editing in Twelve Different Mammalian Species: Hepatic Expression is reflected in low Concentrations of APO B Containing Plasma Lipoproteins.
Journal of Lipid Research, **34**, 1367-1383