

**Physiologische und molekulargenetische
Charakterisierung der Geschlechtsausprägung bei
der Gurke (*Cucumis sativus* L.)**

**Unter besonderer Berücksichtigung der Ethylensynthese und der
Ethylensignaltransduktion**

Vom Fachbereich Gartenbau
Der Universität Hannover
Zur Erlangung
Des akademischen Grades eines

Doktors der Gartenbauwissenschaften
-Dr. rer. hort.-

genehmigte
Dissertation

von
Dipl.- Ing. agr. Heiko Mibus
geboren am 25.03.1972 in Hannover

Referent: Prof. Dr. Turan Tatlioglu

Korreferent: Prof. Dr. Edgar Maiß

Tag der Promotion: 14.07.2003

Kurzfassung

Physiologische und molekulargenetische Charakterisierung der Geschlechtsausprägung bei der Gurke (*Cucumis sativus* L.) unter besonderer Berücksichtigung der Ethylensynthese und der Ethylensignaltransduktion

Die Ausprägung des Geschlechts ist ein fundamentaler biologischer Prozess, dessen genetische und physiologische Aufklärung sowohl aus der Sicht der Evolutionsforschung als auch für die Pflanzenzüchtung von großer Bedeutung ist. Die Familie der Cucurbitaceae aus der die Gurke (*Cucumis sativus* L.) stammt, beinhaltet eine große Anzahl von weiteren weltweit ökonomisch bedeutsamen Kulturpflanzen. Die Wildform der Gurke zeigt einen monözischen Geschlechtstyp mit männlichen und weiblichen Blüten. Die neuen Zuchtmethoden bei dieser Pflanzenart beruhen hauptsächlich auf der Nutzung der Geschlechtsvererbung, insbesondere der Weiblichkeit und ihrer Beeinflussung durch Chemikalien.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, die geschlechtsdeterminierenden Majorgene *Acr/acr* und *M/m* physiologisch und molekulargenetisch zu charakterisieren.

Das Gen *Acr/acr* wirkt auf der Ebene der Gesamtpflanze und führt im dominanten Zustand zu einer weiblichen Geschlechtsausprägung. Physiologisch führt das dominante *Acr* Gen innerhalb der Pflanze zu einer Erhöhung der Ethylenkonzentration. Das verwendete isogene Pflanzenmaterial wird zunächst durch Testkreuzungen und RFLP Analysen bezüglich des *Acr/acr* Gens charakterisiert. Der Nachweis, dass alle monözisch bonitierten Pflanzen am *Acr/acr* Locus heterozygot sind, wird dargestellt und diskutiert. Bei der Analyse von bekannten und in der vorliegenden Arbeit erstmals isolierten unbekanntem ACC-Synthase Genen (Schlüsselenzym der Ethylensynthese) konnte bei der Gurke ein neues ACC-Synthase Gen isoliert und als *CsACS5* bezeichnet werden.

Anschließende Untersuchungen konnten jedoch nur für das Gen *CsACS1* eine Kopplung mit dem *Acr/acr* Gen nachweisen. Nach der Auswertung verschiedener Southern-Hybridisierungsmuster, die durch den Einsatz von *CsACS1* homologen Sonden nachgewiesen wurden, erfolgte die Konstruktion einer Restriktionskarte für den Locus *CsACS1*. Anschließend wurde mittels dieser erstellten Restriktionskarte die mögliche phylogenetische Entwicklung von einer monözischen zu einer gynözischen Geschlechtsausprägung durch die Dupplikation und anschließende Mutation des Gens *CsACS1* dargestellt und diskutiert. Der damit postulierte zusätzliche Locus wurde als *CsACSIG* bezeichnet. Mit Hilfe der erstellten Restriktionskarte erfolgte die spezifische Amplifikation des vermuteten mutierten Allels des Gens *CsACSIG*. Durch die exklusive Amplifikation dieser isolierten Sequenz bei gynözischen (*MM AcrAcr*) und subgynözischen (*MM Acracr*) Genotypen konnte mit großer Wahrscheinlichkeit der Nachweis erbracht werden, dass das dominante *Acr*-Allel isoliert wurde.

Das *M/m*-Gen verhindert im dominanten Zustand in den sonst zwittrigen Blüten die Bildung der männlichen Blütenorgane und führt somit zu rein weiblichen Blüten. Zur molekularen Charakterisierung des *M/m* Gens werden zwei sich ergänzende Strategien durchgeführt. Zum einen wird versucht mittels DDRT-PCR unbekannte Gensequenzen zu isolieren und diese mit dem *M/m* Gen zu korrelieren, zum anderen erfolgt ein Kandidatengenansatz mit Hilfe physiologischer Funktionsstudien der vorliegenden Arbeit. Mittels Durchführung des Differential-Displays (DDRT-PCR) konnten 39 mRNAs nachgewiesen werden, die nur in weiblichen und nicht in hermaphroditischen Blütenknospen exprimiert wurden. Durch die anschließende molekulargenetische Charakterisierung dieser 39 cDNA-Fragmente konnte keine Korrelation mit dem *M/m* Gen nachgewiesen werden.

Aufgrund der zum Beginn der Arbeit vorgestellten Funktionsanalysen des *M/m* Gens kann ein Einfluss auf die Ethylenperzeption oder Ethylensignaltransduktion durch das Produkt des *M/m* Gens vermutet werden. Bei der Analyse der Ethylenperzeption konnte eine erhöhte Expression des Ethylenrezeptors *CsERS* im dritten Wirtel der weiblichen Blüten im Vergleich zu den hermaphroditischen Blüten nachgewiesen werden. Eine mögliche Beeinflussung des *M/m* Gen Produktes auf die differentielle Expression des Gens *CsERS* wird diskutiert.

Durch die Analyse der Ethylensignaltransduktion konnten bei der Gurke erstmals die Gene *CsCTR1*, *CsEIN3*, *CsEIL1*, *CsEIL2*, *CsERF1* und *CsEREBP* partiell und das Gen *CsERF2* vollständig isoliert werden. Die anschließende Analyse dieser Gene bei gynözischen (*MM AcrAcr*) und hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Linien mittels Southern-Hybridisierungen, Sequenz- und Expressionsanalysen konnte keine Korrelation mit dem *M/m* Gen nachweisen. Der mögliche direkte oder indirekte Einfluss der isolierten Ethylensignaltransduktions-Gene auf die Funktion des *M/m* Gen-Produktes wird diskutiert.

Abstract

Physiological and molecular characterisation of sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L) in consideration of ethylene biosynthesis and ethylene signal transduction

The biological processes leading to sex in plants have tremendous significance for plant breeding as well as for evolution studies. The cucurbit family includes a number of economically important crops, e.g. cucumber (*Cucumis sativus* L.).

Most traditional cucumber cultivars are monoecious with male and female flowers. However the shift of emphasis by the plant breeders from open pollinated varieties to F₁ hybrids has stimulated research on the inheritance of sex determination, and the physiological factors that affect it.

The intention of this work was the physiological and molecular characterisation of the major sex determining genes *Acr/acr* and *M/m*.

The dominant *Acr* allele promotes femaleness and shifts the monoecious sex pattern downwards, causing the female phase to start much earlier. It also leads to a higher level of ethylene in the plant.

Nearly isogenic lines were characterized in relation to the *Acr/acr* gene by test crosses and RFLP analysis. Evidence is provided that all phenotypic monoecious plants have a heterozygous *Acr/acr* locus. The analysis allowed isolation of a new ACC Synthase gene (key enzyme of ethylene biosynthesis), designated as *CsACS5*.

Further investigations verified that an additional genomic ACC-synthase sequence (*CS-ACSIG*) exists in gynoecious plants. Therefore a linkage was confirmed between the *Acr* locus and the *CsACSIG* sequence. After exploration of different Southern-hybridisation-patterns originating from different *CsACS1*-probes, a restriction-map of the *CsACS1* locus was constructed. This restriction-map was used to explain the phylogenetic evolution from a monoecious to a gynoecious sex-type. This includes duplication and following mutation of the *CsACS1* gene. The postulated additional locus was designated *CsACSIG*. By using the restriction-map, the mutated allele *CsACSIG* was amplified in a Splinkerette-PCR. An exclusive amplification of the new isolated sequence (*CsACSIG*) in gynoecious (*MM AcrAcr*) and subgynoecious (*MM Acracr*) genotypes confirmed the isolation of the dominant *Acr* allele.

The *M/m* gene in dominant condition suppresses staminal development and thus leads to female flowers. Two complementary strategies were used for molecular characterisation of the *M/m* gene: On one hand the isolation of unknown genes by using DDRT-PCR, on the other hand the isolation of candidate genes after physiological studies. The unknown genes as well as the isolated candidate genes were investigated in relation to the *M/m* locus.

By applying the differential display (DDRT-PCR) on gynoecious and hermaphrodite flowers 39 gynoecious specific mRNA fragments were detected. However, no correlation between these 39 cDNA fragments and the *M/m* locus could be evidenced by the following molecular investigations.

In the second chapter the mode of action of the *M/m* gene was analysed. These results showed that the *M/m* gene product has an effect on the ethylene perception or on the ethylene signal transduction. A higher expression of the ethylene receptor *CsERS* in the third whorl of female flowers was detected when compared to hermaphroditic flowers. A possible influence from the *M/m* Gene product to the differential expression of the receptor (*CsERS*) was discussed.

During analysis of the ethylene signal transduction in cucumber, partial sequences from the following genes were isolated: *CsCTR1*, *CsEIN3*, *CsEIL1*, *CsEIL2*, *CsERF1*, *CsERF2* and *CsEREPP*.

Southern-hybridisation, sequence- and expression- analysis of these genes in gynoecious (*MM AcrAcr*) and hermaphroditic (*mm AcrAcr*) genotypes showed no correlation to the *M/m* locus.

A possible direct or indirect influence from the *M/m* Gene product on the function of ethylene signal transduction genes was discussed.

Schlagwörter

Cucumis sativus L. , Gurke, Geschlechtsausprägung, Ethylensynthese, Ethylensignaltransduktion

Key words

Cucumis sativus L. , Cucumber, sex expression, ethylene biosynthesis, ethylene signal transduction

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Physiologische Untersuchungen zur Geschlechtsausprägung	3
2.1 Einleitung	3
2.1.1 Physiologische Unterschiede eingeschlechtlicher Blüten	3
2.1.2 Molekulare Mechanismen der Blütenmeristemdeterminantion	5
2.1.3 Geschlechtsdeterminierende Gene und die resultierenden Geschlechtstypen.....	9
2.1.4 Einfluss endogener und exogener Phytohormone auf die Geschlechtsausprägung	10
2.1.5 Einflüsse von Umweltfaktoren auf die Geschlechtsausprägung	13
2.1.6 Beeinflussung der Ethylensynthese und –aktivität und ein daraus resultierendes Modell zur Geschlechtsausprägung	13
2.2 Material und Methoden.....	20
2.2.1 Pflanzenmaterial.....	20
2.2.1.1 Herstellung von nahe isogenen Linien.....	20
2.2.1.2 Anzucht der Pflanzen.....	22
2.2.2 Untersuchungen der Blütenmorphologie und der Internodienlänge von verschiedenen Geschlechtstypen.....	23
2.2.3 Pfropfungsversuche.....	23
2.2.4 Kupferbehandlungen.....	24
2.2.5 Applikationsversuche mit Gibberellin und AgNO ₃ bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien	25
2.2.6 Applikationsversuche mit 1-MCP (1-Methylcyclopropene) bei gynözischen Pflanzen.....	26
2.3 Ergebnisse	28
2.3.1 Untersuchungen der Blütenmorphologie und des Habitus verschiedener Geschlechtstypen.....	28
2.3.2 Funktionsanalyse des <i>Acr/acr</i> und <i>M/m</i> Gens mittels Pfropfungsversuche	31
2.3.3 Kupferbehandlungen in Kombination mit AgNO ₃ und Ethephon	34
2.3.4 Physiologische Reaktion auf AgNO ₃ und Gibberellin bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien	36
2.3.5 Physiologische Reaktion gynözischer Geschlechtstypen nach einer 1-MCP Behandlung	38
2.4 Diskussion.....	39
2.4.1 Das Pflanzenmaterial	39
2.4.2 Beurteilung der physiologischen Untersuchungsmethoden	41
2.4.3 Neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise des männlichkeitsinhibierenden Faktors, das <i>M/m</i> Gen	43
2.4.4 Erweiterung und Kritisierung der Ein-Hormonhypothese	49

3 Genetische und Molekulare Charakterisierung des <i>Acr/acr</i> Gens....	56
3.1 Einleitung	56
3.1.1 Klassisch genetische Analysen des <i>Acr/acr</i> Gens.....	56
3.1.2 Die Ethylenbiosynthese und die molekulargenetische Funktion des <i>Acr/acr</i> Gens.....	57
3.2 Material und Methoden.....	63
3.2.1 Pflanzenmaterial.....	63
3.2.2 Kreuzungsanalysen zur genauen Charakterisierung des <i>Acr/acr</i> -Locus in dem verwendeten Pflanzenmaterial.....	64
3.2.3 Statistische Analysen	66
3.2.4 Isolierung von DNA.....	67
3.2.5 Isolierung von RNA.....	68
3.2.6 Amplifikation und Isolierung verschiedener <i>CsACS-Synthase</i> -Gene	69
3.2.6.1 Amplifikation unbekannter <i>ACC-Synthase</i> -Gene durch den Einsatz degenerierter Primer.....	70
3.2.6.2 Amplifikation des bekannten Gens <i>CsACC-Synthase2</i>	72
3.2.6.3 Amplifikation des bekannten Gens <i>CsACC-Synthase1</i>	73
3.2.6.4 Amplifikation des unbekanntes 5`-Endes des Gens <i>CsACC-Synthase1</i> mittels Slinkerette-Methode	76
3.2.6.5 RT-PCR.....	78
3.2.6.6 Einklonierung der Fragmente, Isolierung der Plasmide und Sequenzierung	79
3.2.6.7 Analyse der Sequenzen	80
3.2.7 Southern-Hybridisierung.....	80
3.2.7.1. Restriktion, Elektrophorese und Übertragung der DNA auf eine Membran.....	80
3.2.7.2 Radioaktive Markierung der Sonden, Southern-Hybridisierung und Autoradiographie	81
3.3 Ergebnisse	82
3.3.1 Charakterisierung des <i>Acr/acr</i> Locus in den genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD.....	82
3.3.1.1 Kreuzungsanalysen	82
3.3.1.2 RFLP Analysen.....	87
3.3.2 Isolierung unbekannter <i>ACC-Synthasen</i> bei <i>Cucumis sativus</i> L.....	90
3.3.3 Hybridisierungsstudien mit <i>CsACS2</i> und <i>CsACS1</i> homologen Sonden bei gynözischen, subgynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanzen.....	92
3.3.4 Expressionsanalysen der Sequenzen <i>CsACS5</i> in unterschiedlichen Organen andrözischer und gynözischer Pflanzen.....	93
3.3.5 Molekulargenetische Charakterisierung und Isolierung unbekannter Sequenzbereiche des <i>CsACS1</i> -Gens	94
3.3.5.1 Einsatz verschiedener Enzym/Sonden –Kombinationen zur Charakterisierung des <i>CsACS1</i> -Gens	94
3.3.5.2 Hybridisierung mit verschiedenen Sequenzabschnitten des Gens <i>CsACS1</i> zur Entwicklung einer Restriktionskarte.....	95
3.3.5.3 Sequenzierung der 5`Enden des Gens <i>CsACS1</i> - und der <i>CsACS1G</i> Sequenz und Entwicklung eines PCR gestützten Markers für das dominante <i>Acr</i> -Allel	100

3.4 Diskussion	103
3.4.1 Die methodischen Ansätze	103
3.4.2 Charakterisierung des <i>Acr/acr</i> Gens in dem verwendeten Pflanzenmaterial durch die Kombination klassisch genetischer und Kreuzungsanalysen und molekulargenetischer Methoden.....	104
3.4.3 Analyse bekannter und unbekannter ACC-Synthasen bei der Gurke.....	107
3.4.4 Analyse des Gens <i>CsACSI</i>	108
3.4.5 Nutzung der neuen Erkenntnisse zur direkten Amplifikation des dominanten <i>Acr</i> - Allels.....	112
4 Molekulargenetische Charakterisierung des <i>M/m</i> Gens	114
4.1 Einleitung	114
4.1.1 Klassisch genetische und physiologische Charakterisierung des <i>M/m</i> Gens	114
4.1.2 Die Ethylensignalperzeption und der Ethylensignaltransduktionsweg	115
4.1.2.1 Die Ethylenrezeptoren und ihre Wirkungsweise.....	115
4.1.2.2 Die Ethylensignaltransduktion	117
4.2 Material und Methoden.....	120
4.2.1 Detektion von unterschiedlichen exprimierten mRNAs bei isogenen gynözischen und hermaphroditischen Linien	120
4.2.1.1 Pflanzenmaterial.....	120
4.2.1.2 RNA Isolierung	120
4.2.1.3 DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)	121
4.2.1.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	123
4.2.1.5 Visualisierung der Fragmente durch Silberfärbung	123
4.2.1.6 Reamplifikation und Isolierung der polymorphen Fragmente	124
4.2.1.7 Klonierung und Sequenzierung der polymorphen Fragmente	125
4.2.1.8 Korrelationsstudien der detektierten Fragmente mittels Southern-Hybridisierungen.....	125
4.2.1.9 Überprüfung der Expression der isolierten polymorphen DDRT-Fragmente.....	125
4.2.2 Charakterisierung und Isolierung von Genen der Ethylensignalperzeption und Ethylentransduktion zur spezifischen Aufklärung der molekularen Wirkungsweise des <i>M/m</i> Gens.....	127
4.2.2.1 Pflanzenmaterial	127
4.2.2.2 DNA Isolierung.....	127
4.2.2.3 Amplifikation, Einklonierung und Sequenzierung	127
4.2.2.4 Hybridisierung mit <i>Arabidopsis</i> Sonden der Ethylensignaltransduktion.....	128
4.2.2.5 Amplifikation und Sequenzanalysen der Ethylenrezeptoren bei <i>Cucumis sativus</i>	130
4.2.2.6 Homologievergleiche von Genen der Ethylensignaltransduktion zur anschließenden Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung konservierter Sequenzbereiche bei <i>Cucumis sativus</i> L.	131
4.2.2.7 Hybridisierung mit <i>C. sativus</i> spezifischen Sonden der Ethylensignaltransduktionsgene.....	132
4.2.2.8 Isolierung der vollständigen cDNA Sequenzen der Ethylensignaltransduktionsgene von hermaphroditischen und gynözischen Genotypen	132

4.2.2.9 Expressionsanalysen von Genen der Ethylenperzeption und Ethylen- signaltransduktion bei spezifischem Gewebe des dritten Wirtels (Antheren) ...	136
4.2.2.10 Sequenzvergleiche der Ethylensignaltransduktionsgene von hermaphroditischen und weiblichen Genotypen	137
4.3 Ergebnisse	138
4.3.1 DDRT-PCR.....	138
4.3.1.1 Nachweis differentiell exprimierter mRNAs bei weiblichen und zwitterigen Knospen	138
4.3.1.2 Analyse der detektierten cDNA Fragmente mittels Southern- Hybridisierungen und Sequenzanalysen	139
4.3.1.3 Transkriptionsanalyse der detektierten mRNAs mittels RT-PCR.....	142
4.3.2 Analyse der Ethylenperzeption und Ethylensignaltransduktion	144
4.3.2.1 Molekulare Charakterisierung von Genen der Ethylenrezeptoren <i>CsETR1</i> , <i>CsETR2</i> und <i>CSERS</i> bei gynözischen und hermaphroditischen Linien.....	144
4.3.2.2 Molekulare Charakterisierung von Genen der Ethylensignaltransduktion bei gynözischen und hermaphroditischen Linien	147
4.3.2.2.1 Kopplungsanalysen mit unterschiedlichen Genen der Ethylensignaltransduktion mit dem <i>M/m</i> Gen	147
4.3.2.2.2 Sequenzvergleiche zwischen konservierten Bereichen von Genen der Ethylensignaltransduktion bei <i>Cucumis sativus</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	150
4.3.2.2.3 Sequenzvergleiche der konservierten Bereiche von Genen der Ethylensignaltransduktion zwischen gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen	151
4.3.2.2.4 Analyse der 5`- und 3`-cDNA Enden der Ethylensignaltransduktionsgene.....	152
4.3.2.2.5 Expressionsanalysen der Ethylensignaltransduktionsgene mit spezifischem Gewebe der weiblichen und zwitterigen Blüten.....	154
4.4 Diskussion	157
4.4.1 Das Pflanzenmaterial	157
4.4.2 Die methodischen Ansätze	157
4.4.3 Nachweis unterschiedlich exprimierter mRNAs.....	160
4.4.4 Isolierung und Charakterisierung von Genen der Ethylenperzeption und Ethylensignaltransduktion	162
5 Zusammenfassung.....	167
6 Literatur	169
7 Anhang	185
8 Danksagung	220
9 Lebenslauf.....	221

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABA	Abscisic Acid
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ACO	ACC Oxidase
ACS	ACC Synthase
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AVG	aminoethoxyvinylglycine
C	Cytosin
cDNA	copy Deoxyribonukleinsäure (reverse transkribierte mRNA)
<i>Cs</i>	<i>Cucumis sativus</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
<i>CTR1</i>	constitutive triple response 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz
<i>EIL1, 2 und 3</i>	ethynlene insensitive 3 like 1, 2, 3
<i> EIN2 und 3</i>	ethylene insensitive 2, 3
<i>EREBP</i>	ethylene-responsive element binding protein
<i>ERF</i>	ethylene respore factor
<i>ERF1, 2, 3, 4, 5 und 6</i>	ethylene responsive element binding factor 1, 2, 3, 4, 5, 6
<i>ERS1 und 2</i>	ethylene response sensor
<i>ETR1 und 2</i>	ethylen response 1 und 2
G	Guanin
GA _(n)	Gibberellinsäure (n = Gibberellinsäureart)
IAA	Indol-3-essigsäure
kb	Kilobasen
M	Molar
MAP	mitogen-activated protein
MBq	Megabequerel
1-MCP	1-methylcyclopropene
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ppm	Parts per Million
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumsalz-Citrat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
xg	Erdbeschleunigung

1 Einleitung

Die Fremdbefruchtung verhindert die nachteilige Wirkung der Inzucht und fördert durch den Austausch und die Neukombination von Erbfaktoren die genetische Variabilität und die Heterozygotie. Diese Faktoren ermöglichen einer Pflanzenart Selektionsvorteile und damit eine bessere Anpassung an veränderte Umweltbedingungen.

Im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung der Blütenpflanzen entstanden eine Vielzahl von Mechanismen zur Förderung der Fremdbefruchtung. Die wichtigsten Fremdbefruchtungsmechanismen sind die Selbstinkompatibilität, die heterologe Geschlechtsorganentwicklung (Heterosytlie), die asynchrone Blühzeit (z. B. Protogynie) und die männliche bzw. weibliche Sterilität, deren kerngenetische Ausprägung als evolutionäre Vorstufe zur Entwicklung von getrenntgeschlechtlichen Blüten gesehen wird.

Obwohl eine hohe 'Fremdbefruchtungsrate' meist zu einem Selektionsvorteil führt, ist die Anzahl der Pflanzenarten mit getrenntgeschlechtlichen Blüten im Vergleich zu den zwittrig blühenden Pflanzenarten gering. Nach der Auswertung der Geschlechtsausprägung von 120.000 Pflanzenarten zeigte sich, dass ca. 72 % aller Pflanzenspezies ausschließlich zwittrige Blüten ausbilden. Eine strikte diözische (männliche und weibliche Individuen) bzw. monözische (Individuen mit männlichen und weiblichen Blüten) Geschlechtsausprägung zeigen 4% bzw. 7% der Pflanzenarten. Zwischenformen mit androdiözischen bzw. gynodiözischen Populationen (eingeschlechtliche und hermaphroditische Individuen) wurden bei 10 % aller betrachteten Pflanzenarten beobachtet. Individuen mit eingeschlechtlichen und zwittrigen Blüten (andromonözisch und gynomonözisch) zeigen ca. 7 % der Pflanzenarten (YAMPOLSKY und YAMPOLSKY 1922).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erforschung der physiologischen und molekulargenetischen Mechanismen der getrenntgeschlechtlichen Blütenentwicklung. Die Aufklärung dieser Entwicklungsprozesse ist aus unterschiedlichen Gründen von besonderer Bedeutung. Zum einen ist der Ertrag in den Kulturarten, bei denen die Früchte und Samen geerntet werden, abhängig von der Ausbildung der generativen Geschlechtsorgane. Dies gilt insbesondere für die weiblichen Geschlechtsorgane, aus denen sich Früchte und Samen entwickeln. Zum anderen ist bei der Produktion von Hybridsaatgut die Befruchtung des Saatgutelters durch eigenen Pollen zu verhindern. Dies kann in einer besonders effektiven Weise durch die Nutzung von Pflanzen mit eingeschlechtlichen Blüten erfolgen. Weiterhin kann die Erforschung der getrenntgeschlechtlichen Blütenentwicklung einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis phylogenetischer Prozesse beitragen. So nehmen getrenntgeschlechtlich blühende Populationen bei der evolutionären Entwicklung der Blütenpflanzen eine entscheidende Schlüsselfunktion ein.

Die Familie der Cucurbitaceae, aus der die Gurke (*Cucumis sativus* L.) stammt, beinhaltet eine große Anzahl von weiteren weltweit ökonomisch bedeutsamen Kulturpflanzen, z. B. die Melone (*Cucumis melo*) und den Speisekürbis (*Cucurbita maxima*).

Die Gurke besitzt eine Chromosomenzahl von $2n = 14$ und stammt ursprünglich aus einem Gebiet südlich des Himalajas. Die Wildform der Gurke zeigt einen monözischen Geschlechtstyp mit männlichen Blüten im unteren, männlichen und weiblichen Blüten im mittleren und weiblichen Blüten im oberen Sprossbereich. Als Folge einer intensiven züchterischen Bearbeitung existieren jedoch heute bei dieser Kulturpflanze alle in der Natur auftretenden möglichen Geschlechtstypen. Die neuen Zuchtmethoden bei dieser Pflanzenart beruhen hauptsächlich auf der Nutzung der Geschlechtsvererbung, insbesondere der Weiblichkeit und ihrer Beeinflussung durch Chemikalien.

Da bei der Gurke sowohl monözische als auch diözische Geschlechtstypen auftreten, eignet sie sich sehr gut als Modellpflanze zur weiteren Aufklärung von Geschlechtsausprägungsmechanismen.

2 Physiologische Untersuchungen zur Geschlechtsausprägung

2.1 Einleitung

2.1.1 Physiologische Unterschiede eingeschlechtlicher Blüten

Die Grundstruktur einer zwittrigen bzw. ‘perfekten’ Blüte besteht aus vier verschiedenen Bereichen, die meist konzentrisch in Wirteln um den Blütenstiel angeordnet sind. Die beiden äußeren Bereiche bilden die nicht reproduktiven Blütenorgane, Sepalen (Kelchblätter) und Petalen (Blütenblätter). Die beiden inneren Bereiche zeigen die reproduktiven Organe, die Stamina (Staubblätter) und Karpalen (Fruchtblätter).

Bei Pflanzenarten mit einer getrenntgeschlechtlichen Blütenausprägung durchläuft das Blütenmeristem meist ein zweigeschlechtliches Stadium. Das Fehlen von rudimentären Ansätzen der unterdrückten Sexualorgane in eingeschlechtlichen Blüten kann nur bei wenigen Pflanzenarten z.B. *Cannabis sativa* (MONHAN RAM und NATH 1964) und *Spinacia oleracea* (SHERRY et al. 1993) beobachtet werden (zusammengefasst in LEBEL-HARDENACK und GRANT 1997).

Der Entwicklungszeitpunkt der Unterdrückung des jeweils anderen Geschlechtsorgans ist jedoch von Art zu Art sehr unterschiedlich (zusammengefasst in DELLAPORTA und CALDERON-URREA 1993). Bei *Zea mays* erfolgt bei der Geschlechtsdetermination ein programmierter Zelltod des bereits initiierten Meristemgewebes (CHENG et al. 1983). Das frühe Blütenmeristem von *Rumex acetosa* zeigt nur bei weiblichen Blüten männliche Organanlagen. Männliche Blüten dieser Art weisen hingegen keine weiblichen Organvorstufen auf (AINSWORTH et al. 1995). Die Geschlechtsdetermination bei *Asparagus officinalis* findet in weiblichen Blüten und teilweise auch in männlichen Blüten zu einem sehr späten Stadium des Blütenmeristems statt, so dass die rudimentären Organvorstufen gut erkennbar sind (BRACALE et al. 1991; CAPORALI et al. 1994) (zusammengefasst in IRISH und NELSEON 1989).

Während der Entwicklung der Blütenknospen entstehen bei der Gurke zunächst die Anlagen für weibliche als auch für männliche Geschlechtsorgane mit einem ähnlichen Differenzierungsgrad (ATSMON und GALUN 1960). Bei fortschreitender Entwicklung kommt es jedoch durch die Unterdrückung der weiblichen Geschlechtsorgane zur Entstehung von männlichen Blüten bzw. entstehen als Folge einer Wachstumsblockade bei den männlichen Geschlechtsorganen weibliche Blüten. Lediglich bei zwittrigen Blüten entwickeln sich die weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane vollständig (ATSMON und GALUN 1962). Aufgrund dieser Blütenentwicklung können rudimentäre Geschlechtsorgane des jeweilig anderen Geschlechts bei voll entwickelten eingeschlechtlichen Blüten beobachtet werden (siehe auch Abb. 4.4 in Kapitel 4.2.2.1) (KUBICKI 1969f). Bei der Gurke entstehen somit drei unterschiedliche Blütentypen (Abb. 2.1).



Abb. 2.1 : Darstellung einer weiblichen, hermaphroditischen und männlichen Gurkenblüte (von links); bei allen Blüten wurde mit einem Längsschnitt eine Hälfte entfernt.

An einem Nodium treten meist mehrere männliche Blüten als Cluster auf, während weibliche Blüten häufig einzeln oder paarweise an einem Nodium ausgebildet werden (GALUN 1961).

Aus der unterschiedlichen Verteilung der in Abb. 2.1 dargestellten Blütentypen ergeben sich die verschiedenen Geschlechtstypen, die als monözisch (männliche und weibliche Blüten), andrözisch (männliche Blüten), gynözisch (weibliche Blüten), hermaphroditisch (zwitterige Blüten), andromonözisch (zwitterige und männliche Blüten) und trimonözisch (weibliche, zwitterige und männliche Blüten) unterschieden werden können (ATSMON et al. 1965).

Es werden häufig Abweichungen von diesen grundlegenden Geschlechtstypen beobachtet, z.B. Phänotypen, die neben männlichen Blüten lediglich 1-3 weibliche Blüten ausbilden, werden folglich als subandrözisch bezeichnet (KUBICKI 1969d/e). Außerdem werden bei den hermaphroditischen Geschlechtstypen neben den zwitterigen Blüten häufig auch einige männliche Blüten ausgebildet (GALUN 1961, SHIFRISS 1961 und KUBICKI 1969e).

Der ursprünglichen Wildtyp produziert erst männliche Blüten, tritt dann in eine gemischte Phase mit männlichen und weiblichen Blüten ein und entwickelt in der letzten Entwicklungsphase nur weibliche Blüten (GALUN 1961, SHIFRISS 1961).

2.1.2 Molekulare Mechanismen der Blütenmeristemdetermination

Die molekulargenetischen Mechanismen der Blütendetermination wurden im letzten Jahrzehnt bei den Modellpflanzen *Arabidopsis* (BOWMAN et al. 1989, BOWMAN et al. 1991) und *Antirrhinum* (CARPENDER und COEN 1990; COEN et al. 1990; SCHWARZ-SOMMER et al. 1990) untersucht und weitgehend aufgeklärt.

Bei der Determination der Blütenorgane sind drei regulatorische Genklassen beteiligt. Die Meristemidentitätsgene kontrollieren die Initialisierung der Blütenbildung und führen damit zum Wechsel vom vegetativen zum generativen Wachstum. Ein Beispiel eines solchen Gens

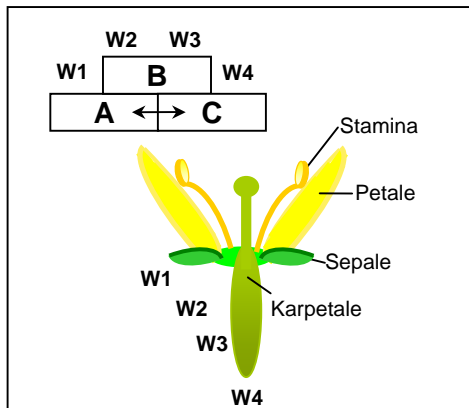


Abb. 2.2: Darstellung des ABC-Modells zur Erklärung der Wirkungsweise von Organidentitäts- bzw. Cadastralgenen.
W1 bis W4 = Wirtel I bis Wirtel 4
↔ = Beeinflussung der Expression
 (nach COEN U. MEYEROWITZ 1991, verändert).

ist *Leafy* bei *Arabidopsis* (WEIGEL et al. 1992). Innerhalb des induzierten Blütenmeristems regulieren Katastergene die Expressionsbereiche der Organidentitätsgene, die dann zur eigentlichen Determination der einzelnen Blütenorgane führen (zusammengefasst in COEN und MEYEROWITZ 1991). Basierend auf Studien von Blütenmutationen wurde ein Modell entwickelt, bei dem die Organidentitätsgene in drei verschiedene Funktionsklassen (A-, B- und C-Funktion) eingeteilt wurden (Abb. 2.2). Dieses Modell erklärt die Interaktionen der Organidentitäts- bzw. Katastergene und die daraus resultierenden vier unterschiedlichen Blütenorgane einer 'perfekten' Blüte.

In einer solchen Blüte führt die Expression der A-Funktionsgene (z.B. *APETALA1* bei *Arabidopsis*; MANDEL et al. 1992) zur Induktion von Sepalen im äußersten Wirtel (W1) und die Expression der C-Funktionsgene (z.B. *AGAMOSE* bei *Arabidopsis*; YANOFSKY et al. 1990) zur Bildung von Karpeltalen im innersten Wirtel (W4) (siehe Abb. 2.2). Die A- und C-Funktionsgene beeinflussen gegenseitig ihre Expression und besitzen damit gleichzeitig die Funktion von Katastergenen (siehe Pfeil in Abb. 2.2). Die B-Funktionsgene (z. B. *APETALA3* bei *Arabidopsis*; JACK et al. 1992) werden unabhängig von den A- und C-Funktionsgenen durch die Wirkung weiterer Katastergene (z. B. *SUPERMAN* bei *Arabidopsis*; SAKAI et al. 1995) nur im zweiten (W2) und dritten (W3) Wirtel expremiert. So entstehen durch die Expression der B-Funktionsgene in Kombination mit den A-Funktionsgenen im zweiten Wirtel (W2) die Petalen und in Kombination mit den C-Funktionsgenen im dritten Wirtel (W3) die Stamina (siehe Abb. 2.2).

Die Meristem- und Organidentitätsgene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die als MADS-Box Familie zusammengefasst werden (benannt nach den ersten vier identifizierten Genen, (zusammengefasst in SHORE und SHARROCKS 1995; THEISSEN und SEIDLER 1995). Die von den MADS-Box Genen kodierten Proteine haben alle einen konservierten Aminosäurebereich am N-Terminus, der sie zur Anlagerung an DNA und zu Interaktionen mit anderen Proteinen

befähigt (SCHWARZ-SOMMER et al. 1990, SHORE und SHARROCKS 1995; THEISSEN et al. 1996). Eine zweite konservierte Region ist die K-Box, die ebenfalls Protein-Proteininteraktionen ermöglicht (MA et al. 1991).

Der Nachweis von homologen Formen dieser Multigenfamilie bei der Blütenentwicklung in Koniferen verdeutlicht die fundamentale Funktion und ihren frühen Ursprung in der Evolution (SOMMER et al. 1990; TANDRE et al. 1995; AINSWORTH et al. 1998). *MADS*-Box Gene wurden in den letzten Jahren bei vielen Pflanzenarten kloniert, z.B.: Petunie (ANGENENT et al. 1993), Kartoffel (GARCIA-MAROTO et al. 1993), Tabak (HANSEN et al. 1993) und Tomate (PNUELI et al. 1991) (zusammengefasst in THEISSEN et al. 1996).

Bei diözischen Pflanzen wurden homologe *MADS*-Box Gene bei *Rumex acetosa* (AINSWORTH et al. 1995), *Silene latifolia* (HARDENACK et al. 1994; FABROS et al. 1997), *Humulus lupulus* (SHEPAHRD et al. 1999) und *Asparagus officinalis* (MILLER et al. 1995, MARZIANI et al. 1999) isoliert und zum Teil durch *in situ*-Hybridisierungen und Expressionsstudien bei der Entwicklung von eingeschlechtlichen Blüten untersucht. Die Expressionsmuster von *MADS* Box Genen der eingeschlechtlichen Blütenknospen von monözischen Pflanzenarten wurden bei *Zea mays* (SCHMIDT et al. 1993; THEIBEN et al. 1995; MENA et al. 1996) und *Cucumis sativus* (KATER et al. 1998; PERL-TREVES 1998a; KATER et al. 2001) untersucht.

Da bei der Determination der generativen Organe die Organidentitätsgene der B- und C-Funktion entscheidend sind (siehe Abb. 2.2), wurden insbesondere die Expressionsmuster dieser Genfunktionsklassen hinsichtlich der Geschlechtsdetermination untersucht. Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungen bei eingeschlechtlichen Blüten zeigen jedoch ein sehr uneinheitliches Bild. So muss davon ausgegangen werden, dass der Geschlechtsausprägungsmechanismus von Pflanzenart zu Pflanzenart eine andere Wirkung auf die *MADS*-Box-Gene ausübt (zusammengefasst in AINSWORTH 1999).

Bei der Gurke wurden drei *MADS*-Box-Gene (*CAG1-3*), die eine Homologie zur *AGAMOUS*-Subfamilie (C-Funktionsgene) aufweisen, isoliert (PERL-TREVES et al. 1998). Identische Gene wurden zeitgleich als *CUM1* (homolog mit *CAG1*) und *CUM10* (homolog mit *CAG2*) publiziert (KATER et al. 1998). Northern-Hybridisierungen zeigten, dass die Gene *CAG1* und *CAG3* gleichermaßen in männlichen und weiblichen Blüten expremiert werden (PERL-TREVES et al. 1998a). Durch *in situ*-Hybridisierungen wurde auch im degenerierten Gewebe der unterdrückten Geschlechtsorgane eine Expression des C-Funktionsgens *CUM1* nachgewiesen (KATER et al. 2001). Weiterhin führten Phytohormonbehandlungen (Ethylen und Gibberellin; weiteres siehe Kapitel 2.1.4) zu keiner Beeinflussung der Expression der isolierten C-Funktionsgene (*CAG1-3*) (PERL-TREVES et al. 1998a). Die Expression des *CAG2* Gens erfolgt lediglich in Karpetalen der weiblichen Blüten (PERL-TREVES et al. 1998a). Auch dieses Gen wurde bereits im Zusammenhang mit der frühen Embryonalentwicklung bei der Gurke isoliert und unter dem Namen *CUS1* veröffentlicht (FILIPECKI et al. 1997).

Bei Mutationsstudien untersuchten KATER et al. (2001) die Morphologie von männlichen und weiblichen Blüten von monözischen Gurkenlinien.

Der Phänotyp einer **A-Funktionsmutante** entwickelte sich als Folge der Überexpression des C-Funktionsgens *CUM1* mittels eines CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S Promotors.

Die Blüten dieser Mutante entwickeln im ersten Wirtel (W1) Karpetalen und im zweiten Wirtel (W2) Stamina (siehe Abb. 2.3). Wie bei den Wildtypen werden jedoch die Stamina bei den weibliche Blüten im dritten Wirtel (W3) und bei den männlichen Blüten die Karpetalen im vierten Wirtel (W4) unterdrückt. Die Stamina im W3 der männlichen Blüten und die Karpetalen im W4 der weiblichen Blüten entwickeln sich unbeeinflusst (KATER et al. 2001) (siehe Abb. 3; A-Mutante).

Die **B-Funktionsmutante** entstand aus einer spontanen rezessiven Mutation und wurde als Mutante green petals (gp) beschrieben (KATER et al. 1998). Bei dieser Mutante zeigt das B-Funktionsgen *CUM26* eine Deletion von 90bp (30 Aminosäuren) und weist bei männlichen Blüten eine temperaturabhängige Ausprägung auf. Die weiblichen und männlichen Blüten der gp Mutante entwickeln in den beiden äußeren Wirteln (W1 und W2) Sepalen.

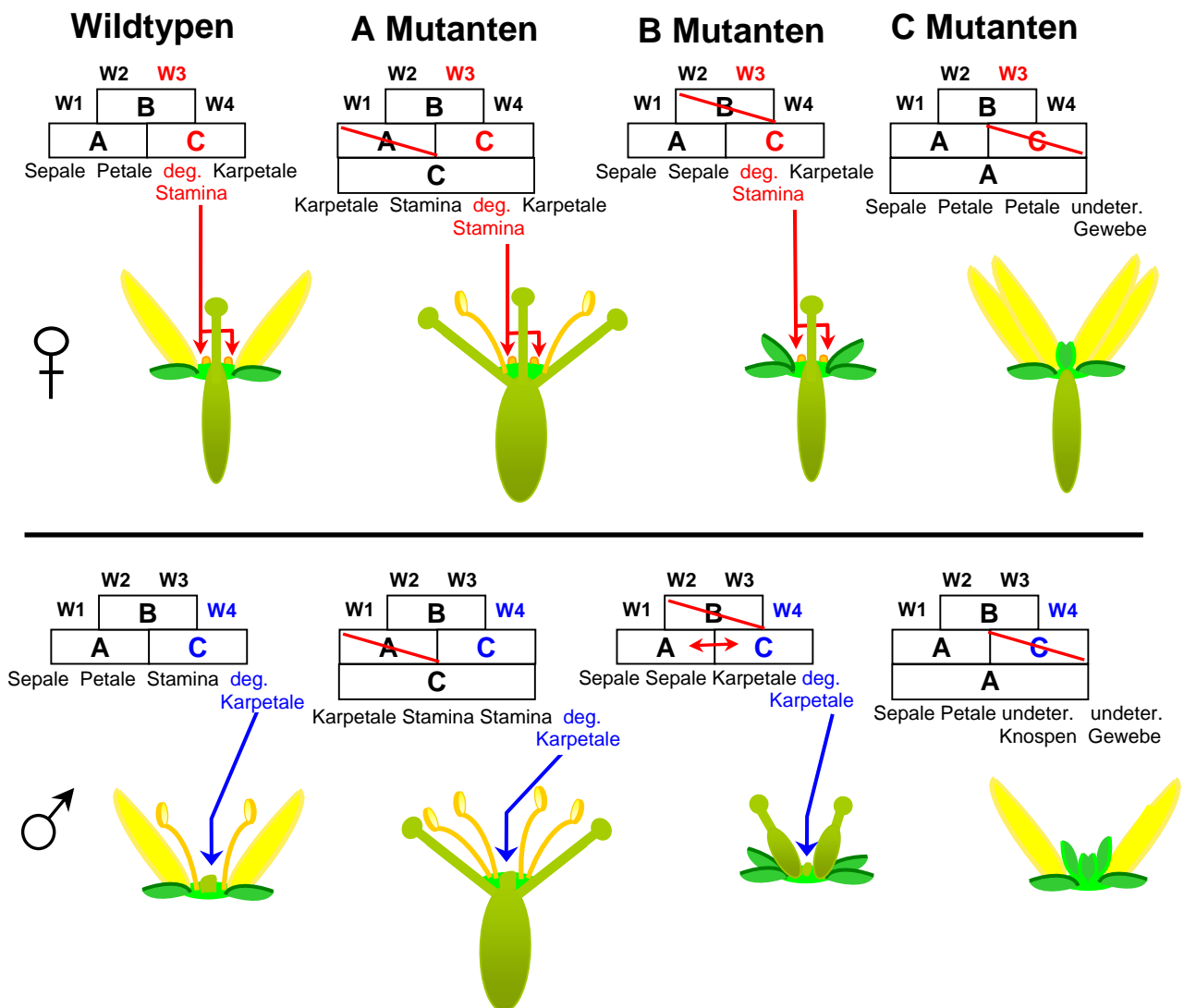


Abb.: 2.3 Darstellung der Auswirkungen von verschiedenen Organidentitätsgen -Mutationen bei *Cucumis sativus* mit dem ABC Modell (siehe Abb. 2.2).

W1 bis W4 = Wirtel I bis Wirtel 4

(eigene Darstellung nach den Ergebnissen von KATER et al. 2001).

Im W3 entwickeln sich bei männlichen Blüten Karpetalen (bei Temperaturen $>30^{\circ}\text{C}$) bzw. undeterminierte Knospen (bei Temperaturen von 22°C). Im Bereich des W4 entwickeln sich wie bei der männlichen Wildform degenerierte Karpetalen. Auch bei den weiblichen Blüten wird im W3 das Auswachsen der Organe unterdrückt und im W4 entwickeln sich Karpetalen (siehe Abb. 2.3; B-Mutante).

Eine Suppression des *CUM1* Gens (C-Funktionsgen) führt zur Ausprägung einer **C-Funktionsmutante**. Bei dieser Mutante entwickeln die Blüten beider Geschlechter im W1 Sepalen, im W2 Petalen und im W4 undeterminiertes Gewebe (siehe Abb. 2.3; C-Mutante). Im Gegensatz zu den Wildtypen entwickeln sich jedoch bei den weiblichen Blüten im W3 Petalen und bei den männlichen Blüten undeterminierte Blütenknospen (siehe Abb. 2.3; C-Mutante) (KATER et al. 2001).

Mit den Mutationsstudien wurde demonstriert, dass sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Blüten die Unterdrückung der Geschlechtsorgane von ihrer Position innerhalb des Blütenmeristems und nicht von ihrer geschlechtlichen Identität abhängt (KATER et al. 2001). So sind zum Beispiel weibliche Blüten der A-Funktionsmutanten in der Lage, im zweiten Wirtel männliche Geschlechtsorgane zu entwickeln (siehe Abb. 2.3). Weiterhin lassen die Untersuchungen vermuten, dass der Geschlechtsausprägungsmechanismus (siehe folgendes Kapitel 2.1.3) bei der Unterdrückung von Karpetalen oder Stamina einen entscheidenden Einfluss auf die C-Funktionsgene hat (KATER et al. 2001). Diese Annahme wird durch die Ausbildung von Petalen im dritten Wirtel der weiblichen Blüten von C-Funktionsmutanten unterstützt. Besteht ein solcher direkter Einfluss zwischen Geschlechtsdetermination und C-Funktionsgenen muss dieser jedoch auf der posttranskriptionalen Ebene stattfinden, da eine Veränderung der Expressionsintensität oder des Expressionsortes der C-Funktionsgene nicht nachgewiesen werden konnte (PERL-TREVES et al. 1998; KATER et al. 2001).

Unter Voraussetzung dieser lokal sehr eingeschränkten Unterdrückung der Organentwicklung bei der Entstehung von eingeschlechtlichen Blüten ist eine Erklärung der unterschiedlichen Funktionsmutationen bei der Gurke mit Hilfe des ABC Modells möglich (siehe Abb. 2.2 und Abb. 2.3).

2.1.3 Geschlechtsdeterminierende Gene und die resultierenden unterschiedlichen Geschlechtstypen

Die direkte oder indirekte Regulation der in Kapitel 2.1.2 beschriebenen C-Funktionsgene und damit die jeweilige lokale Unterbrechung der Geschlechtsorganentwicklung erfolgt durch drei Majorgene: *M/m*, *Acr/acr*, *A/a*. Diese drei Gene sind für die Vererbung und Ausprägung der unterschiedlichen Geschlechtstypen bei der Gurke verantwortlich (TKACHENKO 1935; ROSA 1928; KUBICKI 1969a/b/c/d/e; SHIFRISS 1961; KUBICKI 1972). In Tabelle 2.1 sind die Kombinationsmöglichkeiten dieser Gene und die resultierenden Geschlechtstypen zusammengefasst.

Tab. 2.1: Wirkung der Geschlechtsgene bei der Gurke und die daraus resultierenden Geschlechtstypen.

	<i>Acr</i>	<i>acr</i>	
	<i>A</i> oder <i>a</i>	<i>A</i>	<i>a</i>
<i>M</i>	Gynözisch	Monözisch	Andrözisch
<i>m</i>	Hermaphroditisch	Andromonözisch	Andrözisch

Das Gen *Acr/acr* wirkt auf der Ebene der Gesamtpflanze, indem es im dominanten Zustand durch das Überspringen (Acceleration) der männlichen und gemischten Phase die Vorverlegung der weiblichen Phase hervorruft (SHIFRISS 1961b). Eine Pflanze mit dem *Acr/acr*-Gen im dominanten Zustand braucht jedoch nicht unbedingt nur weibliche Blüten zu produzieren. Sie kann in Abhängigkeit von anderen Genen und Umweltfaktoren auch männliche oder/und hermaphroditische Blüten produzieren (weiteres siehe Kapitel 3.1.1). Eine Linie mit dem dominanten *Acr*-Gen zeigt jedoch immer eine höhere Weiblichkeit als eine isogene am *Acr/acr*-Locus rezessive Linie (ROBINSON et al. 1976). Die Dominanz von *Acr* über *acr* ist nicht immer vollständig; sie ist stark vom genetischen Hintergrund und von Umweltfaktoren abhängig (KUBICKI 1969 a/b) (weiteres siehe Kapitel 3.1.1).

Das Gen *M/m* wirkt auf der Ebene der Einzelblüte. Im dominanten Zustand verhindert es die Bildung von männlichen Blütenorganen, so dass anstatt zwittrigen weibliche Blüten entstehen (GALUN 1961 SHIFRISS 1961b, KUBICKI 1969d/e) (weiteres siehe Kapitel 4.1.1). Die Dominanz von *M* über *m* ist immer vollständig (TATLIOGLU 1983; BERNMAN et al. 1977).

Das Gen *A/a* führt im rezessiven Zustand zur Entstehung von andrözischen Pflanzen (*MM acracr aa* oder *mm acracr aa*) (KUBICKI 1969d/e). Es ist gegenüber dem dominanten Gen *Acr* hypostatisch und wirkt folglich nur bei *acracr*-Genotypen (weiteres siehe Kapitel 3.1.1).

Die Gene *M/m*, *Acr/acr* und *A/a* werden unabhängig voneinander vererbt (GALUN 1961, KUBICKI 1969 a-c) und wurden in drei verschiedenen Kopplungsgruppen kartiert (PIERCE und WEHNER 1990).

Weitere Gene, die die Geschlechtsausprägung beeinflussen, sind das Gen *Gy/gy* (KUBICKI 1974), das im rezessiven Zustand die Gynözie fördert und das Gen *Tr/tr* (KUBICKI 1969f), das in dominanter Form zur Ausbildung eines trimonözischen Geschlechtstyps führt. Die wichtigsten Gene, die die Blütenausprägung beeinflussen, werden mit ihren Synonymen und der Wirkungsweise zusammengefasst in Tab. 2.2 dargestellt.

Tab. 2.2: Gene, die bei der Gurke die Blütenausprägung beeinflussen (TATLIOGLU 1993, verändert).

Symbol	Synonym	Wirkungsweise
<i>A/a</i>		andrözisch führt im rezessiven Zustand zur Ausbildung von männlichen Blüten, wenn <i>Acr/acr</i> rezessiv ist
<i>Acr/acr</i>	<i>F, acr^F, st⁺</i>	gynözisch führt im dominanten Zustand zu einem hohen Grad von Weiblichkeit
<i>Gy/gy</i>		gynözisch fördert im rezessiven Zustand die weibliche Geschlechtsausprägung
<i>M/m</i>	<i>a,g</i>	hermaphroditisch fördert im rezessiven Zustand die Ausbildung von zwittrigen Blüten
<i>M2/m2</i>		hermaphroditisch 2 fördert im rezessiven Zustand die Ausbildung von zwittrigen Blüten
<i>Tr/tr</i>		trimonözisch führt im dominanten Zustand zur Ausbildung von weiblichen, männlichen und zwittrigen Blüten an einer Pflanze

2.1.4 Einfluss endogener und exogener Phytohormone auf die Geschlechtsausprägung

Definitionsgemäß sind Phytohormone Botenstoffe, die die Entwicklungsprozesse innerhalb eines Organismus koordinieren (KANDELER 1972). Sie werden in der Regel nur in bestimmten Gewebe oder Organen der Pflanze gebildet und von dort aus auf unterschiedliche Weise in andere Gewebe und Organe transportiert. Durch die Bindung des Hormons an einen Rezeptor der kompetenten Zelle erfolgt eine spezifische Signaltransduktion (siehe auch Kapitel 4.1.2) (zusammengefasst in MOHR und SCHOPFER 1992). Die Regulation dieser hormonellen Signalinduktion findet auf zwei Ebenen statt, einerseits durch die Variation des Hormonspiegels bei gleichbleibender Empfindlichkeit des Rezeptors und andererseits durch Variation der Empfindlichkeit bzw. Affinität des Rezeptors bei gleichbleibendem Hormonspiegel (KLÄMBT 1987). Hormone besitzen eine multiple Wirksamkeit, d.h. ein und dasselbe Hormon kann in verschiedenen Zellen verschiedene physiologische Reaktionen

bewirken. Außerdem steuert die Interaktion von zwei oder mehreren Phytohormonen zahlreiche entwicklungsbiologische Prozesse in Pflanzen, wie z.B. Zellform und Zellgröße, Sprosswachstum und Blüteninduktion (MOHR und SCHOPFER 1992). Auch die Geschlechtsausprägung der Gurke wird entscheidend von Phytohormonen beeinflusst. Im Folgenden wird die Funktion der Phytohormone Ethylen, Auxin, Gibberellin und Abscisin im Zusammenhang mit der Geschlechtsausprägung dargestellt. Die Untersuchungsergebnisse basieren auf exogenen Behandlungen oder auf Messungen endogener Hormonkonzentrationen.

Ethylen (C₂H₄)

Die Ethylensynthese erfolgt in der gesamten Pflanze. Besonders starke Konzentrationen wurden jedoch in reifenden Früchten und in keimenden Samen gemessen. Das Ethylen wird gasförmig in den Interzellularen oder über das Xylem als Stoffwechselforstufe ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylsäure) transportiert (BRADFORD und YANG 1980; ELESE et al. 1993;).

Da eine direkte Behandlung und Dosierung mit dem gasförmigen Ethylen schwierig ist, erfolgt meist eine Applikation mit Ethephon (2-chloroethylphosphonic acid), eine Verbindung die Ethylen im pflanzlichen Gewebe freisetzt (YANG 1969).

Behandlungen mit Ethephon von monözischen, andrözischen und hermaphroditischen Linien führen zu einer Ausbildung von weiblichen Blüten bei Nodien, die normalerweise männliche bzw. hermaphroditische Blüten ausbilden (RUDICH et al. 1969; ROBINSON et al. 1969; GEORGE 1971; RUDICH et al. 1972a/b; TAKAHSHI und SUGE 1982). Durch Ethylenkonzentrationsmessungen konnte nachgewiesen werden, dass gynözische Linien mehr Ethylen produzieren als monözische Linien. Hingegen wurden keine Ethylenkonzentrationsunterschiede zwischen weiblichen und hermaphroditischen bzw. zwischen monözischen und andromonözischen Linien nachgewiesen (ATSMON und TABBAK 1979; TREBITSH et al. 1987; YAMASAKI et al. 2001).

Auch bei anderen *Cucurbitaceae*, z.B. *Cucumis melo* (Melone) (RUDICH et al. 1969) und *Cucurbita pepo* (Kürbis) (HUME und LOVELL 1983), wurde im Vergleich zu monözischen Pflanzen bei gynözischen Pflanzen eine höhere Ethylenproduktion gemessen.

Da das Ethylen bei der Geschlechtsausprägung eine entscheidende Schlüsselrolle einnimmt, wird im Kapitel 2.1.6 auf den Syntheseweg und die Ethylensignaltransduktion näher eingegangen.

Auxin (IAA)

Die Syntheseorte des Auxins sind zum Beispiel Pollen und meristematisches Gewebe. Der Transport erfolgt basipetal in Keimscheiden und im Spross (DAVIES 1995).

Nach der Behandlung mit naphthylacetic acid (NAA), einer dem natürlichen Auxin sehr ähnlichen Verbindung, ist eine signifikante Erhöhung der weiblichen Blüten bei monözischen und andrözischen Gurken zu beobachten (LAIBACH und KRIBBEN 1950). Diese Förderung der

Weiblichkeit beruht jedoch nicht auf einer direkten Reaktion auf das Auxin, sondern wird durch die Erhöhung der Ethylenkonzentration nach einer Auxinapplikation hervorgerufen (siehe Abb. 2.4 in Kapitel 2.1.6); (SHANNON und de la GUARDIA 1969; TREBITSH et al. 1987; TREBITSH et al. 1997). Diese Förderung der Ethylensynthese und damit der Ethylenkonzentration durch Auxin wurde bei einer großen Anzahl weiterer Pflanzenarten bestätigt (zusammengefasst in ABELES et al. 1992).

Gibberellin (GA)

Die Gibberellinsyntheseorte sind zum Beispiel Blattanlagen und junge Blätter. In der Pflanze erfolgt der Transport meist unipolar (MOHR und SCHOPFER 1992).

Nach einer Gibberellinbehandlung von gynözischen Gurkenlinien zeigte sich eine eindeutige Förderung der Männlichkeit (WITTEWER und BUCOVAC 1958, GALUN 1959b; SHIFRIS und GEORGE 1964). Weiterhin zeigte sich, dass die Gibberelline GA₇, GA₄, und GA₃ die männliche Blütenausprägung am deutlichsten fördern (GALUN 1959b; WITTEWER und BUCOVAC 1962; CLARK und KENNEY 1969; FRIEDLANDER et al. 1977a; FUCHS et al. 1977). Bei monözischen Linien wurde im Vergleich zu weiblichen Linien eine höhere Konzentration von gibberellinähnlichen Verbindungen gemessen (ATSMON 1968; ATSMON et al. 1968; FRANKELN und GALUN 1977). Die molekulare Wirkungsweise des Gibberellins auf die Geschlechtsausprägung bei der Gurke konnte bis heute nicht aufgeklärt werden (YIN und QUINN 1995b). Nach einer Gibberellinapplikation von gynözischen Linien wurde keine Änderung der Ethylenkonzentration nachgewiesen (ATSMON und TABBAK 1979). Auch Untersuchungen anderer Pflanzenarten zeigten keine oder sehr unterschiedliche Effekte von Gibberellin auf die Ethylenkonzentration (ABELES et al. 1992). Jedoch wird von einer negativen Beeinflussung der Ethylenaktivität berichtet, so dass eine antagonistische Wirkung zwischen Ethylen und Gibberellin besteht (siehe Abb. 2.5 in Kapitel 2.1.6) (z. B. Zitrus und Tomate; SHECHTER et al. 1989) (zusammengefasst in ABELES et al. 1992).

Abscisin (ABA)

Die Abscisine werden meist in Blättern und Früchten synthetisiert. Ihr Transport erfolgt in jungen Sprossen basipetal, in älteren aber auch akropetal (MOHR und SCHOPFER 1992).

Nach einer Behandlung mit Abscisin wird von einer Steigerung der Weiblichkeit berichtet (RUDICH und HALEVY 1974, RUDICH et al. 1972). Einige Versuche zeigten jedoch nach einer Abscisinbehandlung keinen Effekt auf die Geschlechtsausprägung (IWAHORI et al. 1970).

In der Sprossspitze von gynözischen Pflanzen wurde im Vergleich zu monözischen eine höhere Abscisinkonzentration gemessen (RUDICH et al. 1972; RUDICH und HALEVY 1974). Eine hohe Abscisinkonzentration führt häufig durch die Förderung der Auxinsynthese (siehe Auxin und Abb. 2.4 in Kapitel 2.1.6) zu einer höheren Ethylenkonzentration (RUDICH et al. 1972a). Außerdem werden eine antagonistische Wirkung zwischen Abscisin und Gibberellin nachgewiesen (siehe Gibberellin und Abb. 2.5 in Kapitel 2.1.6) (RUDICH und HALEVY 1974; RUDICH et al. 1972); (zusammengefasst in ABELES et al. 1992).

2.1.5 Einflüsse von Umweltfaktoren auf die Geschlechtsausprägung

Der Phytohormonhaushalt, der die Geschlechtsausprägung maßgeblich beeinflusst (siehe Kapitel 2.1.4 und 2.1.6), wird nicht nur von genetischen Faktoren gesteuert, sondern steht auch unter direktem und indirektem Einfluss von Umweltbedingungen, die damit je nach Genotyp eine entscheidende Rolle bei der Geschlechtsausprägung spielen (ATSMON 1968; MALEPY und NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1991).

Insbesondere Umwelteinflüsse, die die Ethylen- oder Gibberellinkonzentration beeinflussen, üben eine entscheidende Wirkung auf die Geschlechtsausprägung aus. So kommt es zum Beispiel aufgrund von Staunässebedingungen zu einer Erhöhung der Ethylenkonzentration und damit zur Förderung der Weiblichkeit (siehe Abb. 2.4 in Kapitel 2.1.6) (CHAILAKHYAN und KHRIANIN 1987).

Auch der Photoperiodismus kann einen Einfluss auf die Geschlechtsausprägung der ansonsten tagneutralen Gurke ausüben (NITSCH et al. 1952). So weisen Versuchspflanzen unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht) eine erhöhte Anzahl von weiblichen Blüten auf (FRANKEL und GALUN 1977; VICE-PRUCE 1975). Unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht) zeigte sich dagegen eine erhöhte Ausbildung von männlichen Blüten (CANTLIFFE 1981; LOWER 1975; LOWER und EDWARDS 1986). Jedoch wird auch von einer Abnahme der Anzahl weiblicher Blüten unter Kurztagbedingungen berichtet (GALUN 1974; GÖNEN 1975). Diese gegensätzlichen Ergebnisse konnten TAKAHASHI et al. (1983) durch den Nachweis von kurztag- und langtagsensitiven Genotypen erklären.

Dass die Tageslänge einen direkten Einfluss auf den Phytohormonhaushalt haben kann, zeigte die Erhöhung der Gibberellinkonzentration bei Langtagbedingungen und eine Erhöhung der Ethylenkonzentration unter Kurztagbedingungen (SAITO und ITO 1964; RUDICH et al. 1972)

Im Widerspruch zu diesen Zusammenhängen stehen die Ergebnisse von TAKAHASHI et al. (1983) bei dessen Vergleich von langtag- und kurztagsensitiven Linien kein eindeutiger Einfluss der Tageslänge auf den Hormonhaushalt nachgewiesen werden konnte.

Auch hohe oder niedrige Temperaturen zeigen eine unterschiedliche Beeinflussung der Geschlechtsausprägung. So wurde durch hohe Temperaturen die Männlichkeit und durch niedrige Temperaturen die Weiblichkeit gefördert (GALUN 1974; CANTLIFFE 1981; LOWER 1975; LOWER und EDWARDS 1986). Nach GÖNEN (1975) fördern jedoch niedrige Temperaturen die Männlichkeit.

2.1.6 Beeinflussung der Ethylensynthese und -aktivität und ein daraus resultierendes Modell zur Geschlechtsausprägung

Wird die Ethylensynthese oder -aktivität durch die Applikation von Chemikalien positiv oder negativ beeinflusst, ist eine direkte Wirkung auf die Geschlechtsausprägung zu beobachten (ATSMON und TABBAK 1979; OWENS et al. 1980; TAKAHASHI und JAFFE 1984; YIN und QINN 1995; zusammengefasst in PERL-TREVES 1999). Aufgrund dieser Ergebnisse nimmt das

Ethylen bei der Geschlechtsausprägung eine entscheidende Schlüsselrolle ein und soll in diesem Kapitel im Zusammenhang mit einem Modell zur Geschlechtsausprägung näher erläutert werden. Eine ausführlichere Darstellung der Ethylensynthese bzw. Ethylensignaltransduktion und der daran beteiligten Gene erfolgt im Zusammenhang mit dem *Acr/acr* Gen in Kapitel 3 und dem *M/m* Gen in Kapitel 4).

Am Anfang der Ethylensynthese steht das S-Adenosylmethionin (AdoMed), das durch die ACC-Synthase zu ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylsäure) synthetisiert wird. Das ACC wird anschließend durch die ACC-Oxidase zu Ethylen oxidiert (siehe Abb. 2.4). Durch die spezifische Hemmung der ACC-Synthase durch AVG (aminoethoxyvinylglycine) wird die Ethylenkonzentration gesenkt (siehe Abb. 2.4) und führt so zu einer Induktion von männlichen Blüten, wobei auch zwittrige Blüten entstehen können (ATSMON und TABBAK 1979; OWENS et al. 1980). Auch die Behandlung mit CoCl_2 führt zu einer Reduzierung der Ethylenkonzentration in der Pflanze als Folge einer ACC-Oxidase Hemmung (siehe Abb. 2.4) (YANG 1980; TAKAHASHI und JAFFE 1984).

Fördernde Faktoren der Ethylensynthese sind, neben den genetischen Faktoren der beteiligten Enzyme (weiteres siehe Kapitel 4.1.2), meist Umwelteinflüsse (siehe Kapitel 2.1.5). Diese Umweltfaktoren zeigen untereinander Wechselwirkungen und wirken in Abhängigkeit zum Genotyp sehr unterschiedlich. Aufgrund dieser Komplexität sollen an dieser Stelle lediglich Beispiele relativ eindeutig wirkender Faktoren genannt werden (siehe Abb. 2.4). So kommt es nach einer hohen Stickstoffdüngung oder bei Staunässebedingungen zu einer Erhöhung der Ethylenkonzentration. Weiterhin führt abiotischer (z. B. Beschädigung) und biotischer (z. B. Schädlingsbefall) Stress zu einer Förderung der Ethylensynthese (siehe Abb. 2.4) und damit auch zu einer erhöhten Weiblichkeit (TJEDJENS 1928; ATSMON 1968; MALEPSZY und NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1991).

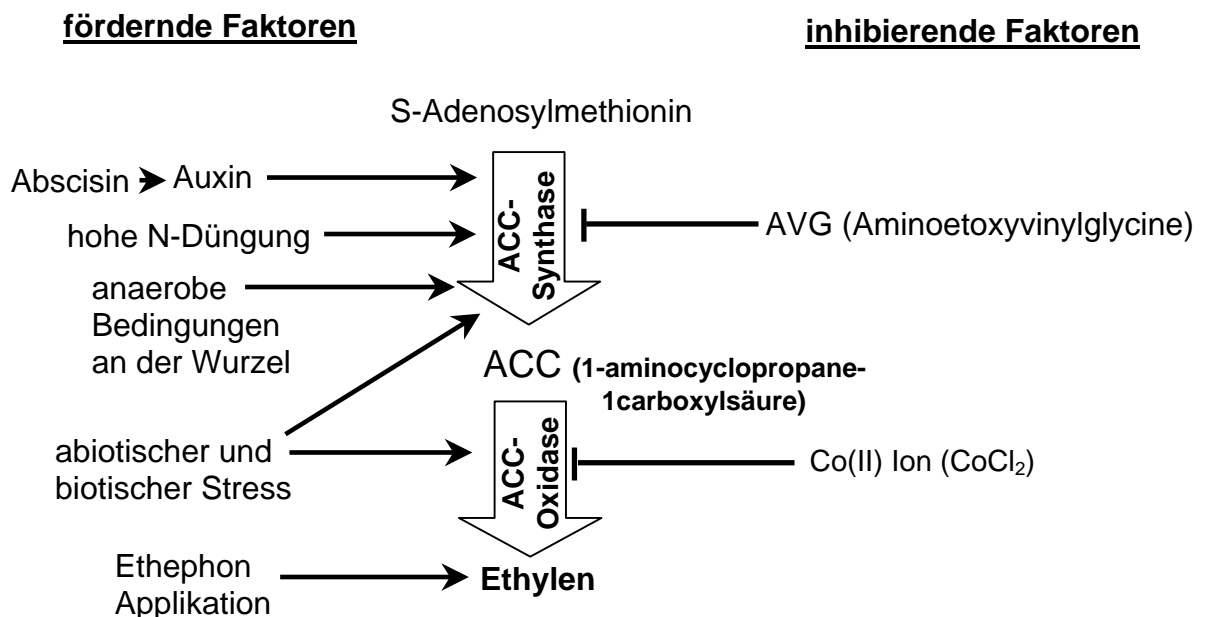


Abb. 2.4: Faktoren mit einem Einfluss auf die Ethylensynthese (ABELES 1992, verändert)
 ➔ = fördernd; —| = inhibierend.

Neben den Faktoren, die direkt die Ethylensynthese beeinflussen, existieren auch Substanzen, die die physiologische Wirkung des Ethylens verändern. So hemmen Silber-Ionen (Ag^+), durch eine Blockierung der Ethylenrezeptoren, die physiologische Wirkung des Ethylens (siehe Abb. 2.5) (zusammengefasst in HIRAYAMA und ALONSO 2000). Kupfer-Ionen (Cu^+) hingegen sorgen als Cofaktor der Ethylenrezeptoren für eine spezifische Bindung des Ethylens und damit für die Induktion und Reizweiterleitung (siehe Abb. 2.5) (RODRIGUEZ et al. 1999). Aufgrund der identischen Bindungsstelle von Ag^+ und Cu^+ -Ionen am Ethylenrezeptor entsteht eine antagonistische Wirkung zwischen dem Cu^+ - und dem Ag^+ -Ion (RODRIGUEZ et al. 1999). Da das Ethylen die Weiblichkeit fördert (siehe Kapitel 2.1.4) führt die Inaktivierung der Ethylenwirkung zur Induktion von männlichen Blüten (siehe Abb. 2.5). Für diese Induktion wird häufig Silbernitrat AgNO_3 verwendet (BEYER 1976a/b; TAKAHASHI und SUGE 1982; TAKAHASHI und JAFFE 1984). Besonders nachhaltig bei der Induktion von männlichen Blüten ist die Verwendung von Silberthiosulfat ($\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2^{3-}$), da es eine höhere Mobilität in der Pflanze besitzt (DEN NIJS und VISSER 1980). Aufgrund der schnellen und eindeutigen Wirkung werden Silbernitrat oder Silberthiosulfat für die Vermehrung von gynözischen Linien und die Durchführung von gynözisch x gynözisch-Kreuzungen in der Züchtung eingesetzt (LOWER und EDWARDS 1986). Silberhaltige Chemikalien sind jedoch aufgrund der toxischen Schwermetalleigenschaften nur noch eingeschränkt einsetzbar (SEREK et al. 1994). So besteht die Notwendigkeit für die Pflanzenzüchtung nach alternativen nicht toxischer Chemikalien zu suchen. Eine mögliche Alternative könnte das 1-MCP (1-methylcyclopropene), mit einer dem Ag^+ Ionen sehr ähnlichen (siehe Abb. 2.5) und für die Pflanzen und Umwelt ungiftigen Wirkungsweise sein (siehe Abb. 2.5) (SEREK et al. 1994). Dieses 1-MCP wird bereits unter dem Handelsnamen 'Ethylbloc' in den USA im *postharves* Bereich der Schnittblumenproduktion eingesetzt. Inwieweit das 1-MCP zur Induktion von männlichen Blüten eingesetzt werden kann, soll in der vorliegenden Arbeit experimentell aufgeklärt werden (siehe Kapitel 2.2.5 und 2.3.5). Eine weitere Fragestellung, mit der sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, sind die Auswirkungen von Cu^+ Ionen auf die Geschlechtsausprägung (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.3.3). Ein besonders interessanter Aspekt bei diesen Untersuchungen ist die antagonistische Wechselwirkung zwischen Cu^+ - und Ag^+ -Ionen während der Geschlechtsdetermination.

Auch durch eine Gibberellinapplikation ist eine Induktion von männlichen Blüten bei weiblichen Linien möglich, diese zeigt jedoch nur bei hohen Konzentrationen eine ausreichende Wirkung (siehe Abb. 2.5 und Kapitel 2.1.4). Da durch Gibberellinbehandlungen die Ethylenkonzentration nicht verändert wird (ASTMON und TABBAK 1979) hemmt das Gibberellin wahrscheinlich die Ethylenaktivität (PERL-TREVES 1999). Der molekulare Mechanismus dieser antagonistischen Wirkungsweise zwischen Ethylen und Gibberellin, der auch bei anderen Pflanzenarten nachgewiesen werden konnte (zusammengefasst in ABELES 1992), ist bis heute jedoch nicht aufgeklärt worden.

Basierend auf dem antagonistischen Effekt zwischen Gibberellin und Ethylen wurden zwei verschiedene Hypothesen zur Erklärung der Geschlechtsdetermination entwickelt; die Zwei-

Hormon-Balance-Hyphothese (RUDICH 1985) und die Ein-Hormonhypothese (YIN und QUINN 1992 und 1995).

Bei der Zwei-Hormon-Balance-Hyphothese fördern beide beteiligten Hormone (Gibberellin und Ethylen) jeweils ein Geschlecht, so dass die relative Balance der beiden Geschlechtshormone den Blütentyp festlegt (RUDICH 1985). Mit Hilfe dieser Hypothese ist jedoch nicht der Wechsel von weiblichen zu männlichen Blüten ohne das hermaphroditische Blüten ausgebildet werden zu erklären.

Die Ein-Hormonhypothese (YIN und QUINN 1992 und 1995) geht davon aus, dass ein Hormon sowohl die Ausbildung weiblicher als auch männlicher Blütenorgane kontrolliert. Dass es sich bei diesem entscheidenden Hormon um das Ethylen handelt, wurde bereits von vielen Autoren vermutet (ATSMON und TABBAK 1979; OWENS et al. 1980; TAKAHASHI und JAFFE 1984) und auch durch die Ergebnisse von YIN und QUINN (1995) bestätigt. Das Gibberellin hingegen ist lediglich indirekt, z. B. durch eine Inhibierung der Ethylenaktivität, an der Geschlechtsdetermination beteiligt.

Grundlagen der Ein-Hormonhypothese sind neben den beschriebenen physiologischen und genetischen Erkenntnissen der Geschlechtsdetermination Untersuchungen, bei denen monözische und hermaphroditische Linien mit Gibberellin und Ethylen und deren Inhibitoren PAC (Paclobutrazol) und Silbernitrat behandelt wurden.

Da die phänotypische Geschlechtsausprägung nur durch die Betrachtung aller Faktoren mit einem Einfluss auf die Geschlechtsausprägung und dessen Wechselwirkungen zu erklären ist, wird im Folgenden die Ein-Hormonhypothese mit weiteren, neuen Untersuchungsergebnissen ergänzt und näher erläutert. Die Ein-Hormonhypothese setzt voraus, dass das Ethylen gleichzeitig, aber unabhängig, die Weiblichkeit fördert und die Männlichkeit hemmt (siehe Abb. 2.5 und Abb. 2.6).

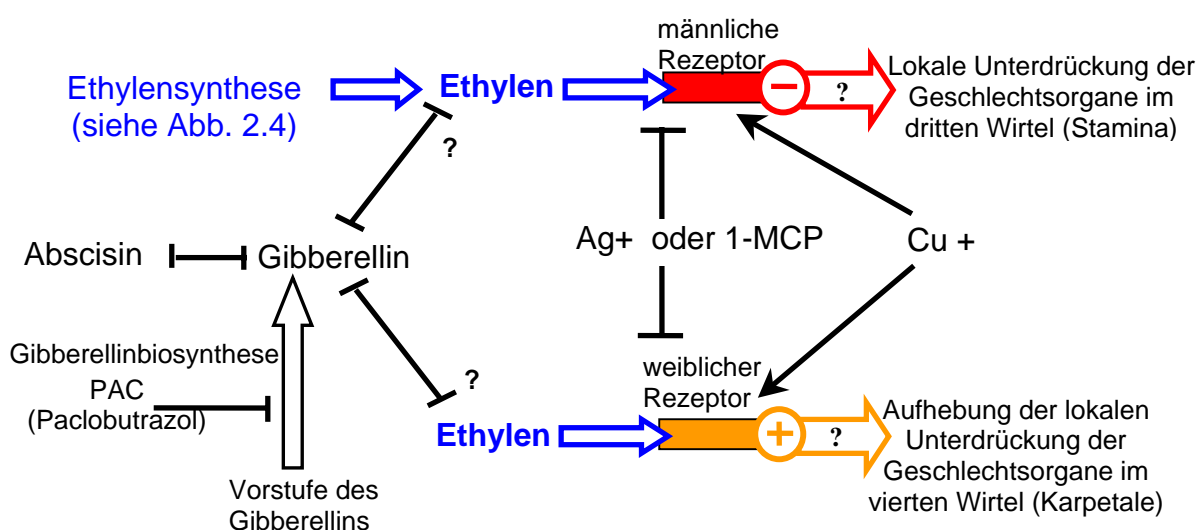


Abb. 2.5: Wirkungsweise der Phytohormone Ethylen und Gibberellin und der Inhibitoren PAC (Paclobutrazol) und AgNO₃ bei der Geschlechtsausprägung nach dem 'Ein Hormonmodell' → = fördernd; —| = inhibierend ; ? = Wirkung nicht aufgeklärt (YIN und QUINN 1995, verändert).

Als Folge der Aktivierung eines spezifischen Ethylenrezeptors (männlicher Rezeptor) kommt es zur lokalen Unterdrückung der Geschlechtsorgane im dritten Wirtel (Stamina) und damit zu rein weiblichen Blüten. Das Ethylen ist jedoch außerdem in der Lage einen zweiten Ethylenrezeptor (weiblicher Rezeptor) zu aktivieren und damit eine Förderung der Geschlechtsorganentwicklung im vierten Wirtel (Karpetalen) zu induzieren (siehe Abb. 2.5). Durch das Einbeziehen der beiden Majorgene *Acr/acr* und *M/m* gelang es YIN und QUINN (1995) mittels der Ein-Hormonhypothese die Wirkungsweise dieser Gene zu erklären. Das Gen *Acr/acr* führt im dominanten Zustand zu einer höheren Ethylenproduktion und verschiebt damit die Konzentrationsspanne des Ethylens auf der Konzentrationsskala in einen höheren Bereich (siehe Abb. 2.6; gynözisch und hermaphroditisch).

Die Ethylenkonzentration konnte bereits vor der Entwicklung dieser Hypothese mit dem *Acr* Locus korreliert werden, da dieser im dominanten Zustand zu einer erhöhten Ethylenkonzentration führt (TREBITSH et al. 1987) (weiteres siehe Kapitel 3.1.2).

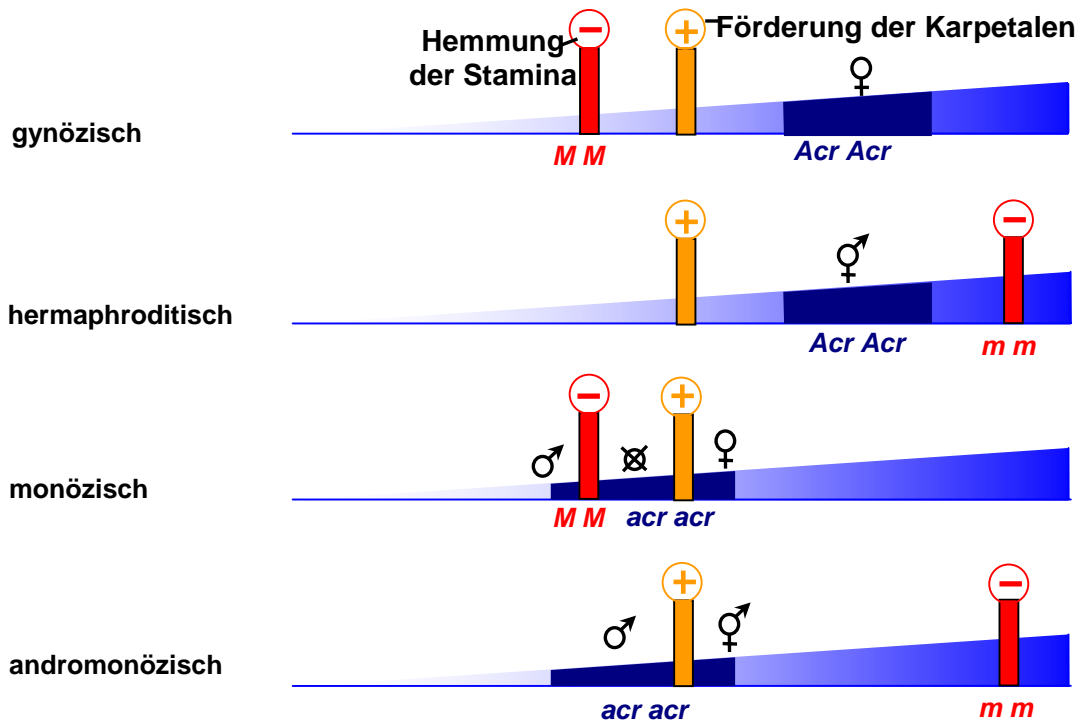


Abb. 2.6: Die Erklärung der physiologischen Wirkung der geschlechtsdeterminierenden Gene *Acr/acr* und *M/m* durch die Ein-Hormonhypothese (YIN und QUINN 1995, verändert).

- = Ethylenskala; = durch das *Acr/acr* Gen bedingte Ethylenkonzentration;
- = männlichkeitsinhibierender Rezeptor (Sensitivität in Abhängigkeit vom Gen *M/m*);
- = weiblichkeitsinduzierender Rezeptor (Sensitivität konstant)
- ♀ = weibliche Blüten; ♀♂ = hermaphroditische Blüten; ♂ = männliche Blüten; ♂⊗ = Blüten ohne Geschlechtsorgane

Die Sensitivität des männlichkeitsinhibierenden Rezeptors wird durch das Gen *M/m* gesteuert, indem das dominante Allel einen sensitiveren Zustand bedingt, so dass schon bei niedrigeren Ethylenkonzentrationen eine Hemmung der Staminaentwicklung erfolgt.

Der weibliche Rezeptor führt dagegen bei gleichbleibender Sensitivität im aktiven Zustand zur Ausbildung weiblicher Blütenorgane. Durch die Variation des Konzentrationsbereiches des Ethylens (*Acr/acr*) und der Variation der Sensitivität des männlichen Rezeptors (*M/m*) entstehen die verschiedenen Geschlechtstypen gynözisch, monözisch, hermaphroditisch und andromonözisch (siehe Abb. 2.6). Da die Ein-Hormonhypothese zwischen der männlichen und weiblichen Phase keine hermaphroditischen Blüten, sondern geschlechtslose Blüten postuliert, bietet sie einen Erklärungsansatz für den monözischen Geschlechtstyp (YIN und QUINN 1995).

Mit Hilfe der Ein-Hormonhypothese können die meisten bis heute veröffentlichten Untersuchungsergebnisse erklärt werden.

Um neue Ansätze und Ideen zur molekulargenetischen Aufklärung der geschlechtsdeterminierenden Gene zu erlangen, soll die Ein-Hormonhypothese als theoretische Basis für die vorliegende Arbeit verwendet werden. Da es sich bei den vermuteten männlichkeitsinhibierenden bzw. weiblichkeitsfördernden Ethylenrezeptoren auch um Elemente der Ethylensignaltransduktion handeln kann (YIN und QUINN 1995), werden diese im Folgenden auch als männlichkeitsinhibierender und weiblichkeitsfördernder Faktor bezeichnet.

Die Funktion des *Acr/acr* Gens wurde zum Teil aufgeklärt (siehe auch Kapitel 3.1), die Isolierung und genaue molekulargenetische Charakterisierung ist bis heute jedoch nicht gelungen und ist das Ziel der in Kapitel 3 dargestellten Untersuchungen. Das Hauptziel des folgenden experimentellen Teils dieses Kapitels besteht darin, die bis heute unbekannt Funktion des *M/m* Gens näher zu untersuchen. Der Expressionsort des *M/m* Gens und ein möglicher Transport des Genproduktes wurden durch Pfropfungsversuche mit gynözischen und hermaphroditischen Genotypen untersucht. Als Kontrollversuch wurden außerdem Pfropfungen zwischen gynözischen und andrözischen Genotypen, die sich am *Acr/acr* Locus unterscheiden, durchgeführt.

Weiterhin sollte der Expressionszeitpunkt des *M/m* Gens durch Behandlungen von hermaphroditischen und weiblichen Genotypen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht werden. Eine mögliche Förderung des Produktes des *M/m* Gens bzw. des postulierten männlichen Rezeptors (siehe oben) wurde durch eine Kupferbehandlung experimentell geprüft.

Neben den Untersuchungen zur Förderung von Ethylenrezeptoren wurde in dem experimentellen Teil dieses Kapitels auch die Inhibierung von Ethylenrezeptoren weiter untersucht (siehe Kapitel 2.1.6). So werden die ersten Ergebnisse der Induktion von männlichen Blüten bei rein gynözischen Genotypen nach der Behandlung mit einem neuen Inhibitor (1-MCP) dargestellt.

Außerdem wurden die blütenmorphologischen Besonderheiten des verwendeten Pflanzenmaterials charakterisiert und fotografisch dokumentiert. Neben diesen

Untersuchungen wurde auch die Blütenverteilung und die Position der morphologisch unterschiedlichen Blüten bestimmt.

Alle Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen zur Geschlechtsausprägung sollen weitere Informationen liefern, die als Grundlage zur Isolierung des *M/m* (Kapitel 4) und des *Acr/acr* Gens (Kapitel 3) notwendig sind. Außerdem sollen die Ergebnisse dieses Kapitels zu neuen Erkenntnissen über die physiologischen Wechselwirkungen der geschlechtsdeterminierenden Gene *Acr/acr*, *M/m* und *A/a* führen.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Pflanzenmaterial

2.2.1.1 Herstellung von nahe isogenen Linien

Die bei der Untersuchung verwendeten gynözischen, andrözischen, monözischen und hermaphroditischen isogenen Linien gehen auf die Arbeiten von GÖNEN (1975); FRANKEN (1979) und TATLIOGLU (1981 und 1983) zurück.

Die Erstellung der rein weiblich blühenden bzw. gynözischen Pflanzen erfolgte durch GÖNEN (1975), dessen Fragestellung unter anderem die Aufklärung der Vererbung des Geschlechts bei determinierten Pflanzen war. Aus diesem Grund kreuzte GÖNEN (1975) nicht determinierte Gurkensorten verschiedener Herkunft mit einer determinierten, monözischen Linie, die von W. L. GEORGE, Connecticut Experiment Station, New Haven, dem Institut für Angewandte Genetik zur Verfügung gestellt wurde.

Unter den als Mutter verwendeten Eltern waren eine monözische Linie (*Cetro*) und drei weitgehend gynözische Linien (*Epros*, *Witlorobust* und *Epram*). Die ingezüchtete Vaterlinie besaß hauptsächlich männliche Blüten, bildete aber in einem späteren Stadium an der Spitze weibliche Blüten aus (GÖNEN 1975). Die vier vorhandenen Mutterlinien wurden jeweils mit den determinierten Vaterlinien gekreuzt. In der F₃ Nachkommenschaft erfolgte eine Selektion von gynözischen und monözischen Linien mit determiniertem Wuchs. Aus diesen selektierten und anschließend geselbsten Pflanzen entstanden die gynözischen und monözischen Linien WrD, ED und ECD. FRANKEN (1979) erstellte bei nachfolgenden Arbeiten durch Kreuzung mit den gynözischen Linien (WrD, ED und ECD) mit den hermaphroditischen Linien MSU 7152H und MSU 4108H, die von Dr. BAKER Michigan State University, East Lansing, USA, zur Verfügung gestellt wurden, determinierte hermaphroditische Linien. Diese hermaphroditischen Linien besitzen neben den zwittrigen Blüten auch einige männliche Blüten. Im Gegensatz zu den andromonözischen Geschlechtstypen, bei denen erst nach einer rein männlichen Phase zwittrige Blüten entstehen, beginnen die hermaphroditischen Linien bereits im ersten generativen Nodium mit der Ausbildung von zwittrigen Blüten.

Zur Herstellung von isogen gynözischer, monözischer, andrözischer und hermaphroditischer Linien wurde im Institut für Angewandte Genetik 1979 ein Rückkreuzungsprogramm begonnen (TATLIOGLU 1981 und 1983) und bis heute fortgesetzt. Dabei dienten die drei oben erwähnten gynözischen Linien mit verschiedenen genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD (GÖNEN 1975; FRANKEN 1979) als Rückkreuzungseltern. Als hermaphroditische Linien wurden WrD und ECD, die aus der Kreuzung mit MSU 4108H selektiert worden waren, und die hermaphroditische Linie ED, die aus der Kreuzung mit MSU 7152H entstanden ist (FRANKEN 1979), verwendet. Als Beispiel ist die Herstellung von isogen gynözischen und hermaphroditischen Linien in Abb. 2.7 dargestellt, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit bis heute fortgesetzt wurde.

Zunächst erfolgte die Parentalkreuzung zwischen einer gynözischen und einer hermaphroditischen Pflanze (I) (Abb. 2.7). Durch eine Behandlung mit AgNO_3 wurden männliche Blüten bei gynözischen Pflanzen induziert, so dass diese durch eine Selbstung erhalten werden konnten. Anschließend erfolgte die erste Rückkreuzung (II) durch die Kreuzung der am M/m Locus heterozygoten Nachkommenschaft der Parentalkreuzung und der gynözischen Linie (Abb. 2.7). Die Nachkommenschaft der ersten Rückkreuzung war phänotypisch weiblich, spaltet jedoch am M/m Locus in 50% heterozygote und 50% homozygote dominante Pflanzen auf. Nach der Selbstung dieser Nachkommenschaft (III) erfolgte somit bei der Hälfte der Nachkommenschaften eine Aufspaltung von gynözisch und hermaphroditisch blühenden Pflanzen (Abb. 2.7).

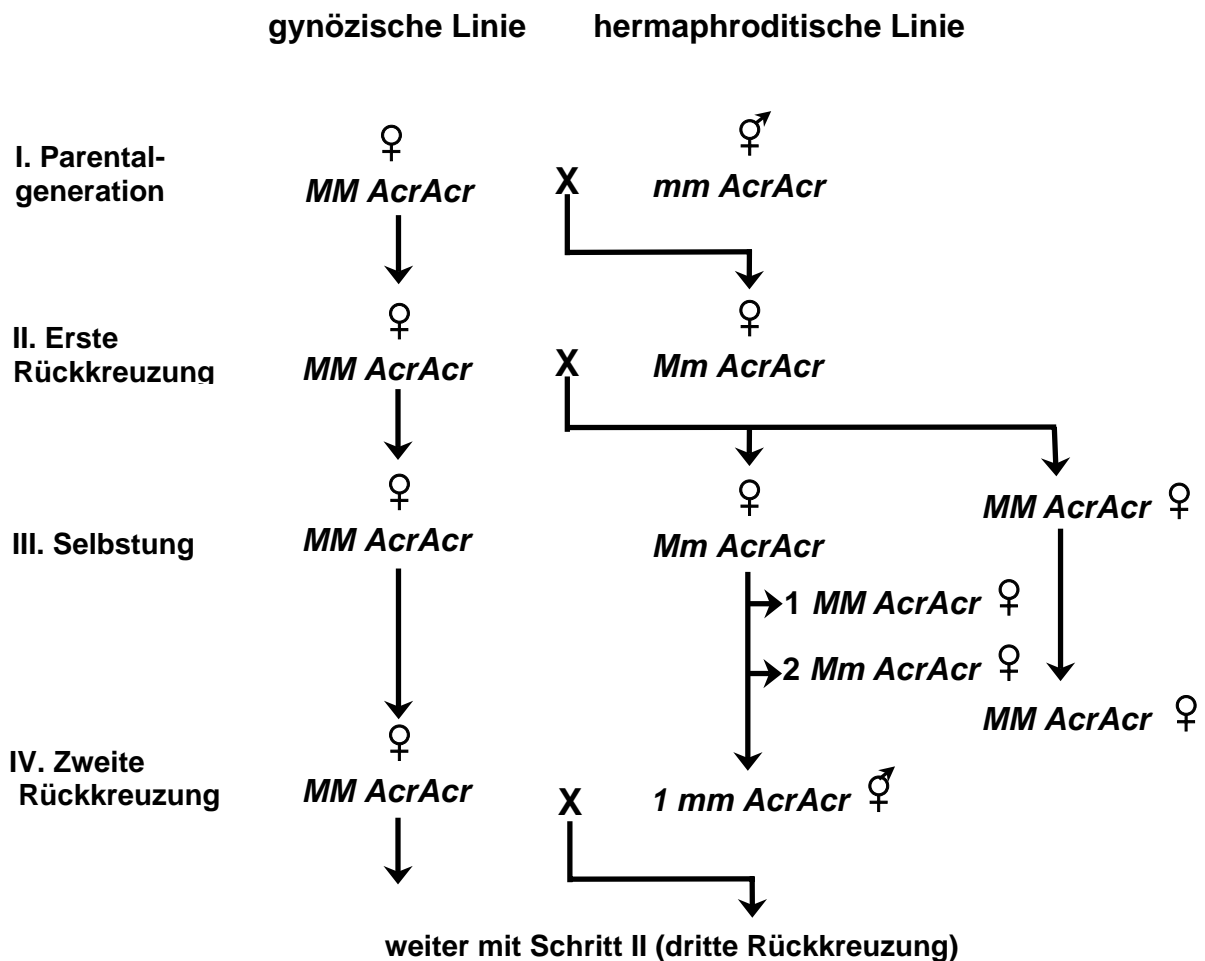


Abb. 2.7: Kreuzungsprogramm zur Herstellung von isogen gynözischen und hermaphroditischen Linien (nach TATLIOGLU 1983, verändert).

Unter Verwendung der hermaphroditischen Pflanzen als männlicher Kreuzungspartner erfolgte dann die zweite Rückkreuzung mit der durch Selbstung erhaltenen gynözischen Linie. So gelang es, innerhalb der drei genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD nach jeweils 8 Rückkreuzungen annähernd isogen gynözische und hermaphroditische Linien herzustellen, die 99,8 % identische Gene besitzen.

Die Determination (De/de) weist eine monogen rezessive Vererbung auf und wird als Ausbildung eines terminalen Blütenstandes des Haupttriebes beschrieben (GÖNEN 1975). In

Abhängigkeit von Umweltbedingungen kann der Wachstumsstillstand durch die Ausprägung des terminalen Blütenstandes zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten erfolgen, so dass die Nodienanzahl und damit die Pflanzenlänge variiert (GÖNEN 1975; FRANKEN 1979). Dieser determinierte Wuchs erwies sich bei der Selektion von monözischen und andrözischen Geschlechtstypen innerhalb der Nachkommenschaften als problematisch (siehe auch Kapitel 3.2.1). Der monözische Geschlechtstyp beginnt mit einer rein männlichen Phase und entwickelt erst später weibliche Blüten (GALUN 1961, SHIFRISS 1961). Da jedoch das Wachstum von determinierten monözischen Geschlechtstypen häufig abgeschlossen wird, bevor die Pflanzen weibliche Blüten hervorbringen, ist die Unterscheidung von andrözischen und monözischen Genotypen schwierig. Folglich können monözische Genotypen (*MM acracr AA*) rein männlich blühen und damit phänotypisch einen andrözischen Geschlechtstyp zeigen (GÖNEN 1975; FRANKEN 1979). Die damit entstehende phänotypische Andrözie kann in dem verwendeten Pflanzenmaterial nicht von der genotypischen Andrözie (*.. acracr aa*) unterschieden werden. Aufgrund dieser Eigenschaften des Pflanzenmaterials wurden keine monözischen Geschlechtstypen in die Untersuchungen einbezogen und die verwendeten andrözischen Linien als phänotypisch andrözisch bezeichnet.

Um die Entstehung des monözischen Geschlechtstyps im verwendeten Pflanzenmaterial genauer zu charakterisieren, wurden die in Kapitel 3.3.1 dargestellten Testkreuzungen und RFLP-Analysen durchgeführt.

Das zur Herstellung der isogenen phänotypisch andrözischen Linien verwendete Rückkreuzungsprogramm entspricht im Wesentlichen dem in Abb. 2.7 dargestellten Schema (weiteres siehe Kapitel 3.2.1; Abb. 3.2).

2.2.1.2 Anzucht der Pflanzen

Die Aussaat erfolgte nach einer Beizung des Saatguts in Quikpotplatten, als Substrat diente die Einheitserde P.

Die Jungpflanzen wurden im 2-3 Blattstadium in 12er Tontöpfe getopft. Anschließend wurden sie auf eine 2-3 cm dicken Torfmullschicht gestellt, an Stäben hochgebunden und bei einer Tag/Nacht Temperatur von 24°/18°C oder 30°/24°C bei den Kupferbehandlungen (Kapitel 2.2.3) kultiviert.

Die Kultivierung der in Kapitel 2.2.4 verwendeten Versuchspflanzen (Physiologische Reaktionen bei unterschiedlichem Alter und Induktion von männlichen Blüten bei gynözischen Linien) erfolgte auf einer 3 cm dicken Fließmatte. Die Düngung erfolgte einmal wöchentlich mit (N+P+K+Mg)-Flüssigdünger, abwechselnd mit 2 ‰ (15+10+15+2) und (8+12+24+4).

Die Versuchspflanzen erhielten eine tägliche 16h Zusatzbeleuchtung mit 400W Na-Hochdrucklampen (ca. 3500-4000 lux).

2.2.2 Untersuchungen der Blütenmorphologie und der Internodienlänge von verschiedenen Geschlechtstypen

Um die Besonderheiten der Blütenmorphologie zu charakterisieren wurden von allen Nachkommenschaften aus den drei genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD die Morphologie der unterschiedlichen Blüten unter dem Binokular untersucht und fotografisch (Digitalkamera: *Dimàge RD 3000* der Firma Minolta) dokumentiert. Neben diesen Untersuchungen wurde auch die Blütenverteilung und die Position der morphologisch unterschiedlichen Blüten bestimmt.

Wie einleitend beschrieben steht die Wirkung der Majorgene *M/m*- und *Acr/acr* höchstwahrscheinlich in einem direkten Zusammenhang mit der Ethylensynthese bzw. der Ethlenaktivität. Da Ethylen zu einem gestauchten Wachstum führt (MOHR und SCHOPFER 1992), erfolgte eine Messung der Internodien bei den verschiedenen Geschlechtstypen, um die Wirkung der Gene *M/m*- und *Acr/acr* auf weitere physiologische Einflüsse zu untersuchen. Dabei wurden gynözische, hermaphroditische und phänotypisch andrözische Nachkommenschaften aus den drei genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD untersucht.

2.2.3 Pfropfungsversuche

Der größte Teil der in den letzten Jahrzehnten durchgeführten physiologischen Experimente zur Geschlechtsausprägung basierte auf einer exogenen Beeinflussung des Phytohormonhaushaltes durch Applikationsversuche (siehe Kapitel 2.1.4). Um jedoch die natürlichen Abläufe bei der Geschlechtsausprägung innerhalb der Pflanzen verstehen zu können, müssen Untersuchungen durchgeführt werden, die den Phytohormonhaushalt der Pflanze möglichst nicht beeinflussen.

Pfropfungsversuche stellen eine Untersuchungsmethode dar mit der die unbeeinflusste Wirkungsweise der Majorgene ‚*in vivo*‘ aufgeklärt werden kann. Mittels dieser Pfropfungsversuche kann nicht nur geklärt werden, ob eine Expression der Majorgene *Acr/acr* und *M/m* in der Wurzel oder im Spross erfolgt, sondern auch ob ein Transport zum Wirkungsort in die Sprossspitze stattfindet. Wenn ein solcher Transport von Expressions- oder Folgeprodukten des dominanten *M/m* bzw. des *Acr/acr* Gens stattfindet, ist dieser, unter Berücksichtigung des natürlichen Stofftransportes innerhalb der Pflanze, durch eine veränderte Blütenausprägung der gepfropften Sprossspitze nachzuweisen.

Aus diesem Grund wurde die Wirkungsweise des *M/m* Gens durch reziproke Pfropfungen mit isogen gynözischen (*AcrAcr MM*) und hermaphroditischen (*AcrAcr mm*) Linien aus den genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD untersucht. Zur Bestätigung der Funktion des *Acr/acr* Gens (siehe Kapitel 3) und zur Kontrolle der Pfropfungsmethode erfolgte eine

reziproke Pfropfung zwischen gynözischen (*AcrAcr MM*) und phänotypisch andrözischen (*acracr MM*) Linien aus dem genetischen Hintergrund ECD.

Ein Teil der Pfropfungen aus dem Kontrollversuch zwischen den gynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanzen wurde in Zusammenarbeit mit Frau VURAL durchgeführt (VURAL et al. 2000, MIBUS et al. 2000).

Um alle Wechselwirkungen zwischen den Pfropfungspartnern zu untersuchen, wurden reziproke Einfach- und Zweifachpfropfungen durchgeführt.

Mit Hilfe der Einfachpfropfung, die drei Wochen nach der Aussaat erfolgte, sollten die Effekte der Wurzel auf die gepfropfte Sprossspitze untersucht werden. Es wurden von jedem Genotyp mindestens fünf Pflanzen reziprok miteinander gepfropft. Außerdem wurden Kontrollpfropfungen durchgeführt, bei denen der Genotyp der Wurzel und des Sprosses identisch waren. Nachdem bei allen Versuchspflanzen unterhalb der Keimblätter der Spross entfernt wurde, erfolgte durch einen Keilschnitt die Pfropfung des neuen Sprosses. Die Pfropfungsstelle wurde durch das Umwickeln mit einem Parafilm zusammengehalten und vor Austrocknung geschützt. Um das Anwachsen des Sprosses durch eine erhöhte Luftfeuchtigkeit zu erleichtern, wurden die Pflanzen auf eine 3 bis 5 cm dicke befeuchtete Torfschicht gestellt und mit einer lichtdurchlässigen Kunststoffolie abgedeckt.

Bei der Zweifachpfropfung, die durchgeführt wurde, um die Effekte des Sprosses und der älteren Blätter auf die Blütenausprägung zu untersuchen, wurde anfangs wie bei der Einfachpfropfung verfahren. Nach dem Anwachsen der Sprossspitze erfolgte jedoch eine zweite Pfropfung mit dem Genotyp der jeweiligen Wurzel, indem auf eine Schnittstelle nach dem fünften Nodium die Sprossspitze gepfropft wurde.

Die Bonitur erfolgte jeweils nach 4 Wochen und nach 6 Wochen. Bei dieser Bonitur wurde die Anzahl und die Geschlechtsausprägung der Blüten für jedes einzelne Nodium des Sprosszuwachses gezählt und bestimmt. Der statistische Vergleich erfolgte durch einen χ^2 -Test (Vierfeldtafel) nach SACHS (1978).

2.2.4 Kupferbehandlungen

Aufgrund von *in-vitro* Untersuchungen von Hefezellen, die zuvor mit einem Gen, das bei *Arabidopsis* für einen Ethylenrezeptor kodiert (*ETR1*), transformiert wurden, konnte der Nachweis erbracht werden, dass für die Bindung von Ethylen an Ethylenrezeptoren Kupfer als Cofaktor notwendig ist. So zeigte sich, dass mit *ETR1* transformierte Hefezellen, die in einem mit CuSO_4 angereicherten Medium wuchsen, eine fünffach höhere Ethylenbindung aufwiesen (RODRIGUEZ et al. 1999) (siehe auch Kapitel 4.1).

Aufgrund der in Kapitel 2.1.6 bei der Ein-Hormonhypothese postulierten Funktion von Ethylenrezeptoren während der Geschlechtsausprägung soll dieser Zusammenhang mittels einer CuSO_4 Behandlung in Kombination mit bereits bekannten physiologisch wirksamen Verbindungen untersucht werden. Für die Behandlung wurden jeweils fünf gynözische (*MM*

AcrAcr), hermaphroditische (*mm AcrAcr*) und phänotypisch andrözische (*MM acracr*) Linien aus dem genetischen Hintergrund WrD verwendet. Die Aufzucht der Pflanzen erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben. Drei Wochen nach der Aussaat hatten die Pflanzen vier Blätter ausgebildet und wurden zum ersten Mal behandelt. Die zweite Behandlung erfolgte eine Woche später in einem Entwicklungsstadium mit sieben voll entwickelten Blättern. Fünf Pflanzen von jedem Geschlechtstyp wurden mit jeweils 600 ml pro Behandlung besprüht. Die folgenden verschiedenen Verbindungen wurden in Kombination mit 5% Tween zum optimalen benetzen der Blätter verabreicht:

- 15 mM CuSO₄
- 1,8 mM AgNO₃
- 182,7 µM C₂H₆ClO₃P (Ethephon)
- 15 mM CuSO₄ + 1,8 mM AgNO₃
- 15 mM CuSO₄ + 182,7 µM C₂H₆ClO₃P (Ethephon)
- H₂O (Kontrolle)

Drei Wochen nach der zweiten Behandlung erfolgte die erste Bonitur, bei der die Anzahl und das Geschlecht der Blüten pro Nodium bestimmt wurde. Diese Bonitur wurde zehn Tage später wiederholt. Die Darstellung erfolgt zum besseren Verständnis in graphischer Form. Die angegebenen Blütenzahlen werden in Prozent zur Gesamtblütenzahl angegeben und auf- bzw. abgerundet.

Verwendete Chemikalien:

Kupfersulfat (CuSO₄) Fa. Merck

Silbernitrat (AgNO₃) Fa. Merck

Ethephon (C₂H₆ClO₃P [2-chloroethyl phosphonsäure]) ,*Camposan extra*‘ Fa. Rhone-Poulenc

Tween Fa. Duchefa

2.2.5 Applikationsversuche mit Gibberellin und AgNO₃ bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien

Die in Kapitel 2.2.4 vorgestellten Versuche zur Beeinflussung der Geschlechtsausprägung mittels physiologisch wirksamen Verbindungen erfolgten durch mehrmalige Behandlungen zu verschiedenen Zeitpunkten und damit auch zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Versuchspflanzen. Die Sensitivität zum Ethylen, aber auch die Ethylenkonzentration selbst kann jedoch in Abhängigkeit zum Entwicklungsstadium einer Pflanze große Unterschiede aufweisen (LASHBROOK et al. 1998; *Lycopersicon esculentum*). Um diese Mechanismen im Zusammenhang mit der Ausprägung und Wirkungsweise des *M/m* Gens zu untersuchen, wurden jeweils zehn gynözische (*MM AcrAcr*) und hermaphroditische (*mm AcrAcr*) Linien aus den drei genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD in zwei

unterschiedlichen Entwicklungsstadien behandelt. Die Aufzucht der Pflanzen erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben.

Bei jeder Behandlung wurden fünf Pflanzen von jedem Geschlechtstyp mit 600 ml Applikationslösung besprüht. Dabei wurden entweder 0,29mM Gibberellin 3 (GA₃) oder 1,5mM Silbernitrat (AgNO₃) eingesetzt. Diese Spritzbrühe wurde mit 5% Tween versetzt, um die Blätter optimal zu benetzen. Die erste Behandlung von je fünf Versuchspflanzen wurde ca. zwei Wochen nach der Aussaat im Zweiblattstadium der Versuchspflanzen durchgeführt. Die zweite Behandlung erfolgte direkt am darauf folgenden Tag.

Die Behandlung der zweiten Gruppe von je fünf Versuchspflanzen erfolgte nach ca. sechs Wochen im Stadium von acht voll entwickelten Blättern. Auch diese Pflanzen wurden am darauf folgenden Tag ein zweites Mal behandelt. Fünf Pflanzen von jedem Geschlechtstyp wurden unbehandelt unter gleichen Umweltbedingungen als Kontrolle aufgezogen.

Verwendete Chemikalien:

Gibberellin [(GA₃) C₁₉H₂₂O₆] Fa. Sigma
Silbernitrat (AgNO₃) Fa. Merck
Tween Fa. Duchefa

2.2.6 Applikationsversuche mit 1-MCP (1-Methylcyclopropene) bei gynözischen Pflanzen

Bei der Hybridzüchtung kommen meist rein weibliche Kreuzungspartner zum Einsatz, so dass eine Induktion von männlichen Blüten bei einer der zu kreuzenden Linien notwendig ist. Zu diesem Zweck werden Ag⁻-Verbindungen eingesetzt (AgNO₃, Silberthiosulphat). Da diese jedoch aufgrund ihrer Toxizität nur noch eingeschränkt verwendet werden dürfen, besteht die Notwendigkeit, nicht toxische Verbindungen zur Induktion von männlichen Blüten zu finden. Das nicht toxische 1-Methylcyclopropene (1-MCP) zeigt eine dem Ag⁻-Ion ähnliche Wirkungsweise (siehe Kapitel 2.1.5) und könnte damit als Alternative zur Induktion von männlichen Blüten verwendet werden. Es wird bereits unter dem Handelsnamen Ethylbloc von der Firma Floralife in den USA vertrieben und im Obst- bzw. Zierpflanzenbau eingesetzt. Die Formulierung des Wirkstoffes 1-MCP erfolgte durch den Hersteller (Fa. Floralife) in Pulverform. Durch Zugabe von H₂O wird gasförmiges 1-MCP an die Umgebung abgegeben. Für die Behandlung wurden jeweils fünf gynözische Pflanzen aus den genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD verwendet (Kulturbedingungen siehe Kapitel 2.2.1.2). Bei jeweils fünf Pflanzen pro genetischen Hintergrund wurde nach der Ausbildung des ersten Laubblattes (1/2-Blattstadium) mit der Behandlung begonnen. Diese erfolgte durch das Besprühen der Blätter mit kurze Zeit zuvor in H₂O gelöstem Ethylbloc (250 ppm). Zur optimalen Benetzung wurde zu der Applikationslösung 5% Tween gegeben. Um eine bessere

Wirkung des gasförmigen 1-MCP auf die Jungpflanzen zu erreichen, erfolgte direkt nach dem Besprühen eine Inkubation für ca. 24 Stunden in einem verschlossenen Plastiksack. Diese Behandlung wurde im 1½ Blattstadium wiederholt.

Um den optimalen Behandlungszeitraum festzulegen, erfolgte bei weiteren fünf gynözischen Pflanzen aus allen drei genetischen Hintergründen (WrD, ED und ECD) die erste Behandlung nach der Ausbildung des dritten Laubblattes (1 ½ Blattstadium). Auch bei diesen Versuchspflanzen wurde die Behandlung im 3 ½ Blattstadium wiederholt. Weitere fünf gynözische Pflanzen aus jedem genetischen Hintergrund blieben unbehandelt und dienten als Kontrollpflanzen. Nach der letzten Applikation wurden die Pflanzen getopft und wie in Kapitel 2.2.1.2. beschrieben kultiviert.

Sechs Wochen nach der letzten Behandlung erfolgte die erste Bonitur, bei der die Anzahl und das Geschlecht der Blüten pro Nodium bestimmt wurde. Diese Bonitur wurde zwei Wochen später wiederholt, so dass für jede Pflanze die Geschlechtsausprägung bis zum 38. Nodium bestimmt wurde.

Bei einem zweiten Optimierungsversuch wurden jeweils sieben gynözische Pflanzen des genetischen Hintergrundes WrD im 4 ½ und 8 Blattstadium bzw. im 8 und 11½ Blattstadium behandelt (s. o.). Weitere sieben gynözische Pflanzen blieben unbehandelt und dienten als Kontrollpflanzen.

Verwendete Chemikalien:

Ethylbloc Fa. Floralife (Wirkstoff 1- Methylcyclopropan) 1-MCP
Tween Fa. Duchefa

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Untersuchungen der Blütenmorphologie und des Habitus verschiedener Geschlechtstypen

Die Untersuchung von blütenmorphologischen Besonderheiten erfolgte über die gesamte Versuchszeit bei allen verwendeten Versuchspflanzen.

So wurden bei unterschiedlichen Geschlechtstypen morphologische Abweichungen der Blüten beobachtet, die bei der Bestimmung des Geschlechtstyps der Blüte nicht zum Ausdruck kommen würden und folglich in den folgenden Abschnitten nicht dargestellt werden. Insbesondere die Morphologie der Blüten kann jedoch neue Informationen über die Wirkungsweise der geschlechtsdeterminierenden Gene liefern (weiteres siehe Kapitel 2.4.4).

Bei hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) und bei gynözischen (*MM AcrAcr*) Linien wurde eine unterschiedliche Ausprägung der Weiblichkeit beobachtet. So zeigten sich bei den hermaphroditischen Pflanzen zwittrige Blüten mit einem unterschiedlichen Entwicklungsgrad der Ovarien (siehe Abb. 2.8a). Dieser unterschiedliche Grad der Entwicklung wurde auch bei der Ausbildung der Karpetalen dieser Blüten beobachtet (siehe Abb. 2.8B) und wirkt sich damit auf die gesamten weiblichen Geschlechtsorgane aus. Je älter die Versuchspflanzen waren, um so variabler wurde auch die Ausprägung der Weiblichkeit. Diese unterschiedliche Entwicklung der weiblichen Blütenorgane konnte bei den isogen gynözischen Linien nicht beobachtet werden.



Abb. 2.8 A: Unterschiedlicher Entwicklungsgrad der Karpetalen bei zwittrigen Blüten von hermaphroditischen Pflanzen.

B: Unterschiedlicher Entwicklungsgrad der Karpetalen bei zwittrigen Blüten von hermaphroditischen Pflanzen nach dem entfernen aller Petalen.

Eine weitere Besonderheit der Ausprägung bei weiblichen Blüten wurde nach der Ethephonbehandlung von phänotypisch andrözischen und gynözischen Pflanzen beobachtet. So entwickelten sich neben den normalen epigynen (unterständiges Gynoeceum) weiblichen Blüten auch perigyne (mittelständiges Gynoeceum) weibliche Blüten. Bei diesen bereits von KUBICKI (1969f) im Zusammenhang mit dem *Tr/tr* Gen beobachteten perigyne weiblichen Blüten sind die Karpetalen innerhalb der Blüte nach oben verlagert, so dass diese Blüten, ähnlich den zwittrigen Blüten, keine Vertiefung oberhalb des Fruchtknotens aufweisen (siehe Abb. 2.9; Pfeil).



Abb. 2.9 : Perigyne (A und B) und epigyne (C) weibliche Blüten nach der Ethephonbehandlung von gynözischen Linien; Pfeil = Unterschiedliche Ausprägung der Karpetalen; A = Aufsicht auf eine Blüte. B und C = Längsschnitt durch eine Blüte.

Nachdem das vegetative Wachstum durch die Ausprägung des terminalen Blütenstandes abgeschlossen war, entwickelten sich bei den gynözischen Linien und zum Teil auch bei den

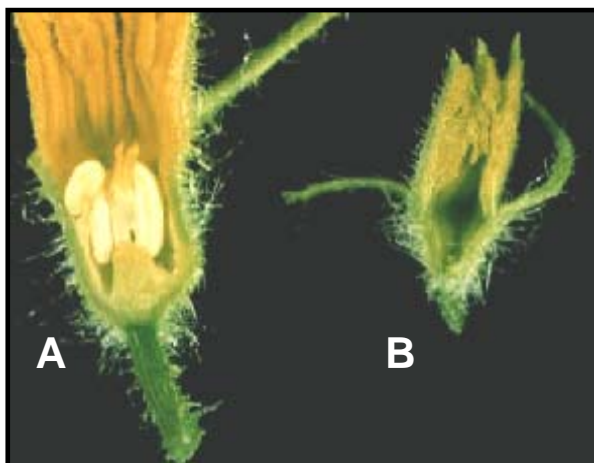


Abb. 2.10: Darstellung eines Längsschnittes einer männlichen Blüte (A) und einer Blüte ohne Geschlechtsorgane (B).

phänotypisch andrözischen Linien geschlechtslose Blüten (Abb. 2.10)

Dieser neue Blütentyp ist kleiner als alle anderen Blütentypen und zeigt eine Blühzeit von ca. einen Tag. Im Vergleich dazu blühen männliche und weibliche Blüten ca. 2 bis 3 Tage. Diese geschlechtslosen Blüten entwickeln sich nur in Nodien, in denen auch weibliche und männliche Blüten entstehen (siehe Abb. 2.11). Da dieser Blütentyp nur bei Pflanzen auftrat die aufgrund ihres

determinierten Wuchses keine neuen Nodien mehr ausbildeten, entwickelten sich die

geschlechtslosen Blüten nur in Nodien in denen die ersten Blüten bereits verblüht waren. An jeder Pflanze entwickelten sich meist nicht mehr als drei bis vier geschlechtslose Blüten. Keiner der durchgeführten Applikationsversuche oder Pfropfungsversuche zeigte eine Erhöhung der Anzahl geschlechtsloser Blüten.

Um die Auswirkungen der Gene *Acr/acr* und *M/m* auf der Ebene der Gesamtpflanzen zu ermitteln, erfolgte bei gynözischen, hermaphroditischen und phänotypisch andrözische Linien die Bestimmung der Nodienanzahl und der Pflanzenlänge (original Messergebnisse siehe

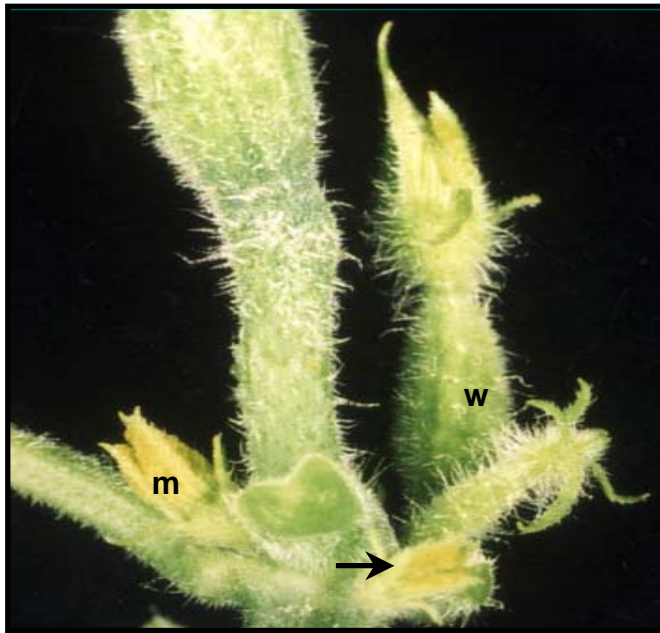


Abb. 2.11: Nodium einer unbehandelten gynözischen Pflanze mit weiblichen (w), männlichen (m) und geschlechtslosen (siehe Pfeil) Blüten nach der Ausbildung des terminalen Blütenstandes.

Anhang 7.1; Tab. 7.1 bis Tab. 7.9). Die Mittelwerte der durch den Quotienten ermittelte Nodienlänge werden in Tab. 2.3 dargestellt. Die Messungen erfolgten innerhalb der drei genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD, um auch mögliche Effekte des genetischen Hintergrundes darstellen zu können. Die gynözischen (*MM AcrAcr*) Linien zeigten im Vergleich zu den hermaphroditischen Linien keinen signifikanten Unterschied zwischen den Nodienlängen (siehe Tab. 2.3). So ist davon auszugehen, dass das *M/m* Gen keinen Einfluss auf dieses Merkmal ausübt. Die phänotypisch andrözischen Linien zeigen jedoch in den genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD

signifikant längere Nodien als die gynözischen Linien. Damit wurde ein Einfluss des *Acr/acr* Gens auf die Nodienlänge der Pflanzen nachgewiesen. Die Mittelwerte basieren auf den Messdaten von mindesten 9 Pflanzen. (siehe Anhang 7.1; Tab. 7.1 bis Tab. 7.9)

Tab. 2.3 Durchschnittliche Nodienlänge der gynözischen, hermaphroditischen und der phänotypisch andrözischen Pflanzen in [cm].

genetischer Hintergrund	Geschlechtstyp			t-Test ♀ & ♀	t-Test ♀ & ♂
	♀ <i>MM AcrAcr</i>	♀ <i>mm AcrAcr</i>	♂ <i>MM acracr</i>		
WrD	5,6	5,55	7,17	n.s.	s.
ED	5,42	5,68	7,13	n.s.	s.
ECD	5,4	5,41	7,16	n.s.	s.
\bar{x} alle Pflanzen	5,5	5,56	7,15	n.s.	s.

Boniturdaten siehe Anhang 7.1; Tab. 7.1 bis Tab. 7.9

n.s. = nicht signifikant bei P=5%; s. = signifikant bei P=5%

2.3.2 Funktionsanalyse des *Acr/acr* und *M/m* Gens mittels Pfropfungsversuchen

Die Einfach- und Zweifachpfropfungen mit einer hermaphroditischen Sprossspitze, die einen möglichen Einfluss des gynözischen Pfropfungspartners und damit des dominanten *M* Allels zeigen sollten, ergaben keine Veränderung der Geschlechtsausprägung des hermaphroditischen Sprosses (Tab. 2.4 a, b und c). So veränderte sich das Verhältnis von männlichen zu zwittrigen Blüten nach der Pfropfung auf eine gynözische Wurzel bzw. auf einen gynözischen Mittelspross mit gynözischer Wurzel im Vergleich zur Kontrollpfropfung nicht (Tab. 2.4 a, b und c).

Tab. 2.4: Anzahl der Blütentypen der hermaphroditischen Sprossspitze nach der Einfach- und Zweifachpfropfung mit gynözischen und hermaphroditischen Linien als Mittelwerte von mindestens 15 Pfropfungen.

	a			b			c		
Pfropfung	♀ (mm <i>AcrAcr</i>)			♀ (mm <i>AcrAcr</i>)			♀ (mm <i>AcrAcr</i>)		
	♂ (mm <i>AcrAcr</i>)			♀ (MM <i>AcrAcr</i>)			♀ (MM <i>AcrAcr</i>)		
Blütentypen	♂ (mm <i>AcrAcr</i>)								
	♀	♂	♂	♀	♂	♂	♀	♂	♂
Anzahl der Blüten/Pflanze	0	27.5	7.5	0	37.5	17.6	0	7.7	5.7

χ^2 -Wert für das Verhältnis von ♀:♂ zwischen a und b beträgt 1.18 (nicht signifikant abweichend) und zwischen a und c 2.19 (nicht signifikant abweichend) bei P=5%, 1 FG; Boniturdaten siehe Anhang 7.2; Tab. 7.10 ♀ = weiblich, ♂ = hermaphroditisch, ♂ = männlich

Auch die reziproken Einfach- und Zweifachpfropfungen, bei denen eine gynözische Sprossspitze auf eine hermaphroditische Wurzel bzw. auf einen hermaphroditischen Spross mit gynözischer Wurzel gepfropft wurde, zeigten keinen Einfluss auf die Geschlechtsausprägung (Tab. 2.5 a, b und c).

Bei der Einfach- und Zweifachpfropfung zwischen den gynözischen und phänotypisch andrözischen Linien, mit denen der Einfluss des *Acr/acr* Gens untersucht werden sollte, veränderte die gynözische Sprossspitze die Geschlechtsausprägung nur gering (Tab. 2.5 a, d und e), da nach der Pfropfung auf die Wurzel einer phänotypisch andrözischen Pflanze 0.3 männliche Blüten pro Pflanze zu beobachten waren (Tab. 2.5 d), und die gynözische Sprossspitze auf dem phänotypisch andrözischen Mittelspross mit gynözischer Wurzel unverändert rein weiblich blühte (Tab. 2.5 e).

Tab. 2.5. Anzahl der Blütentypen der gynözischen Sprossspitze nach der Einfach- und Zweifachpfropfung mit gynözischen, phänotypisch andrözischen und hermaphroditischen Linien als Mittelwerte von mindestens 15 Pfropfungen.

	a			b			c			d			e		
Pfropfung	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♀ (<i>mm AcrAcr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♂ (<i>MM acracr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♂ (<i>MM acracr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♂ (<i>MM acracr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	
Blütentyp	♀	♀	♂	♀	♀	♂	♀	♀	♂	♀	♀	♂	♀	♀	♂
Anzahl Blüten / Pflanze	25	0	0	58	0	0	10.7	0	0	36.2	0	0.3	17.1	0	0

♀ = weiblich, ♀ = hermaphroditisch, ♂ = männlich, Boniturdaten siehe Anhang 7.2; Tab. 7.10 und Tab. 7.11

Wenn jedoch eine phänotypisch andrözische Sprossspitze auf eine gynözische Wurzel gepfropft wurde, wurde eine signifikante Erhöhung der Weiblichkeit bei der phänotypisch andrözischen Sprossspitze beobachtet (Tab. 2.6 a, b). Diese Erhöhung der Weiblichkeit zeigte sich jedoch nur bei der Einfachpfropfung, da nach der Pfropfung einer phänotypisch andrözischen Sprossspitze auf einen gynözischen Mittelspross mit einer phänotypisch andrözischen Wurzel kein signifikanter Einfluss nachzuweisen war (Tab. 2.6c).

Tab. 2.6. Anzahl der Blütentypen der phänotypisch andrözischen Sprossspitze nach der Einfach- und Zweifachpfropfung mit phänotypisch andrözischen und gynözischen Pflanzen als Mittelwerte von mindestens 12 Pfropfungen aus dem genetischen Hintergrund ECD (siehe auch VURAL et al. 2000).

	a			b			c		
Pfropfung	♂ (<i>MM acracr</i>)	♂ (<i>MM acracr</i>)	♂ (<i>MM acracr</i>)	♂ (<i>MM acracr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♂ (<i>MM acracr</i>)	♀ (<i>MM AcrAcr</i>)	♂ (<i>MM acracr</i>)
Blütentyp	♀	♀	♂	♀	♀	♂	♀	♀	♂
Anzahl der Blüten/Pflanze ^z	4.7	0	144	13	0	134	2.8	0	116

χ^2 -Wert für das Verhältnis von ♀:♂ zwischen a und b beträgt 4.36 (signifikant Abweichend) und zwischen a und c 0.21 (nicht signifikant abweichend); bei P=5%, 1 FG; Boniturdaten siehe Anhang 7.2; Tab. 7.10 und 7.11

♀ = weiblich, ♀ = hermaphroditisch, ♂ = männlich

Der nachgewiesene Einfluss der gynözischen Wurzel auf die phänotypisch andrözische Sprossspitze ist bei genauerer Betrachtung der einzelnen Versuchspflanzen sehr unterschiedlich (siehe Anhang 7.2; Tab. 7.11). Diese große Varianz geht jedoch bei dem durchgeführten Mittelwertvergleich verloren. Da diese Effekte genauer untersucht werden

2.3.3 Kupferbehandlungen in Kombination mit AgNO₃ und Ethephon

Die gynözischen Kontrollpflanzen entwickelten in einem späten Stadium einige männliche Blüten, dieser Effekt wurde durch eine CuSO₄ Behandlung unterdrückt, so dass die gynözischen Versuchspflanzen auch im fortgeschrittenen Alter keine männlichen Blüten entwickelten und damit eine stabile Weiblichkeit ausprägten (Abb. 2.13 a und b).

Eine Behandlung mit CuSO₄ führte bei den phänotypisch andrözischen Geschlechtstypen zu einer Erhöhung der Weiblichkeit. So entwickelten nach der CuSO₄ Behandlung 4% der Nodien weibliche Blüten (2% ♀♂ + 2% ♀). Dieser Anteil Nodien mit weiblichen Blüten betrug bei den Kontrollpflanzen lediglich 1% (Abb. 2.14 a und b). Die CuSO₄ Behandlung von hermaphroditischen Pflanzen führte zu keiner Veränderung der Geschlechtsausprägung (Abb. 2.15 a und b).

Nach einer Applikation mit AgNO₃ zeigten die gynözischen, hermaphroditischen und phänotypisch andrözischen Geschlechtstypen die erwartete erhöhte Männlichkeit (Abb. 2.13, Abb. 2.14 und Abb. 2.15; jeweils a und c) (siehe auch Kapitel 2.1.6).

Diese Wirkung des Silbernitrat wurde jedoch bei den gynözischen und phänotypisch andrözischen Geschlechtstypen durch eine zusätzliche Behandlung mit CuSO₄ vollständig revidiert (Abb. 2.13 e und 2.14 e).

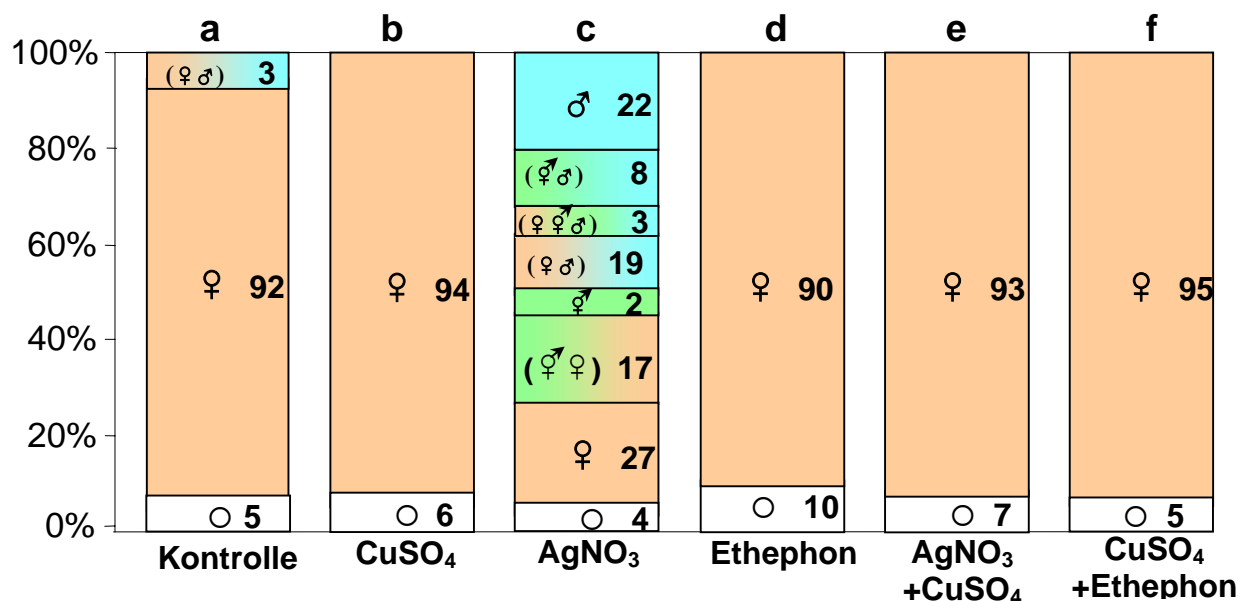


Abb. 2.13: Prozentuale Nodienzahl entsprechend ihrer Geschlechtsausprägung bei gynözischen Pflanzen nach der Behandlung mit CuSO₄, AgNO₃ und Ethephon; ○ = keine Blüten; Boniturdaten siehe Anhang 7.3.1.

Bei den hermaphroditischen Versuchspflanzen wurde die Wirkung des AgNO₃ durch die zusätzliche Behandlung mit CuSO₄ nur unvollständig aufgehoben (Abb. 2.15 e). So entwickelten die hermaphroditischen Versuchspflanzen nach einer Kombinations-Behandlung mit AgNO₃ und CuSO₄ einen Anteil von 21% rein männlicher Nodien, dieser lag bei den Kontrollpflanzen bei 8% und nach der AgNO₃ Behandlung bei 45% (vgl. Abb. 15 a, c und e).

Eine eindeutige Förderung der Weiblichkeit nach einer Ethephonbehandlung wurde bei den phänotypisch andrözischen Geschlechtstypen beobachtet (vgl. Abb. 2.14 a und d). Dagegen zeigten die hermaphroditischen Versuchspflanzen nach der Ethephonbehandlung nur eine geringe Förderung der Weiblichkeit (vgl. Abb. 2.14 a und d mit Abb. 2.15 a und d).

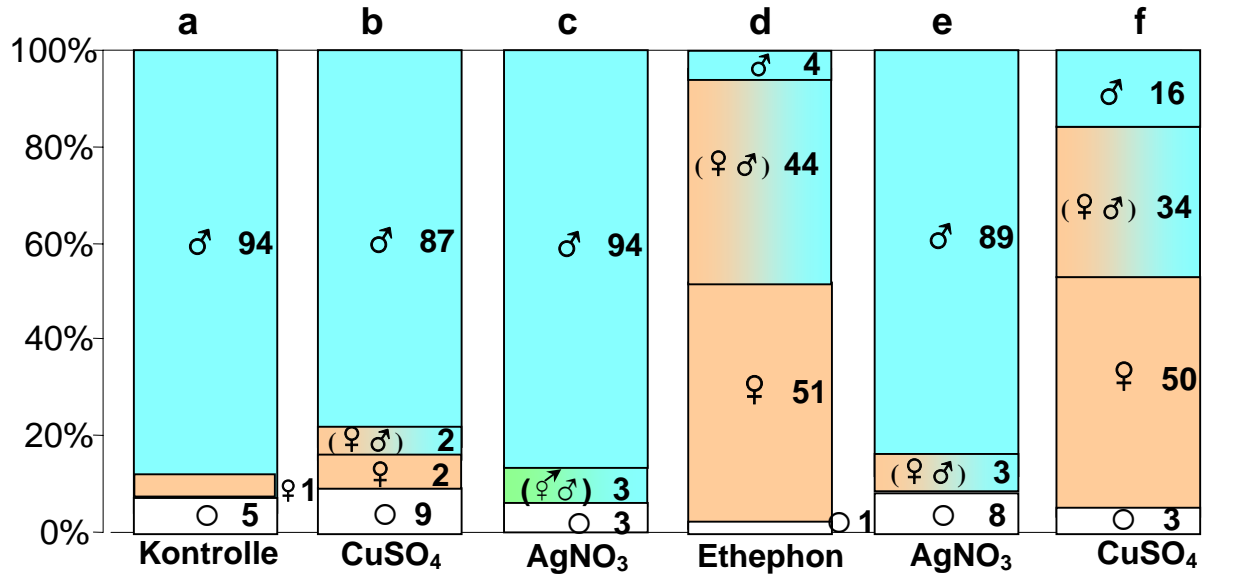


Abb. 2.14: Prozentuale Nodienzahl entsprechend ihrer Geschlechtsausprägung bei phänotypisch andrözischen Pflanzen nach der Behandlung mit CuSO₄, AgNO₃ und Ethephon; ○ = keine Blüten; Boniturdaten siehe Anhang 7.3.1.

Während bei den phänotypisch andrözischen Pflanzen die Kombination von Ethephon und CuSO₄ im Vergleich zu einer Ethephonbehandlung zu keiner Erhöhung der Weiblichkeit führte (vgl. d und f in Abb. 2.14), wurde durch die gemeinsame Wirkung von Ethephon und CuSO₄ bei den hermaphroditischen Geschlechtstypen eine eindeutig höhere Weiblichkeit beobachtet (vgl. d und f in Abb. 2.15).

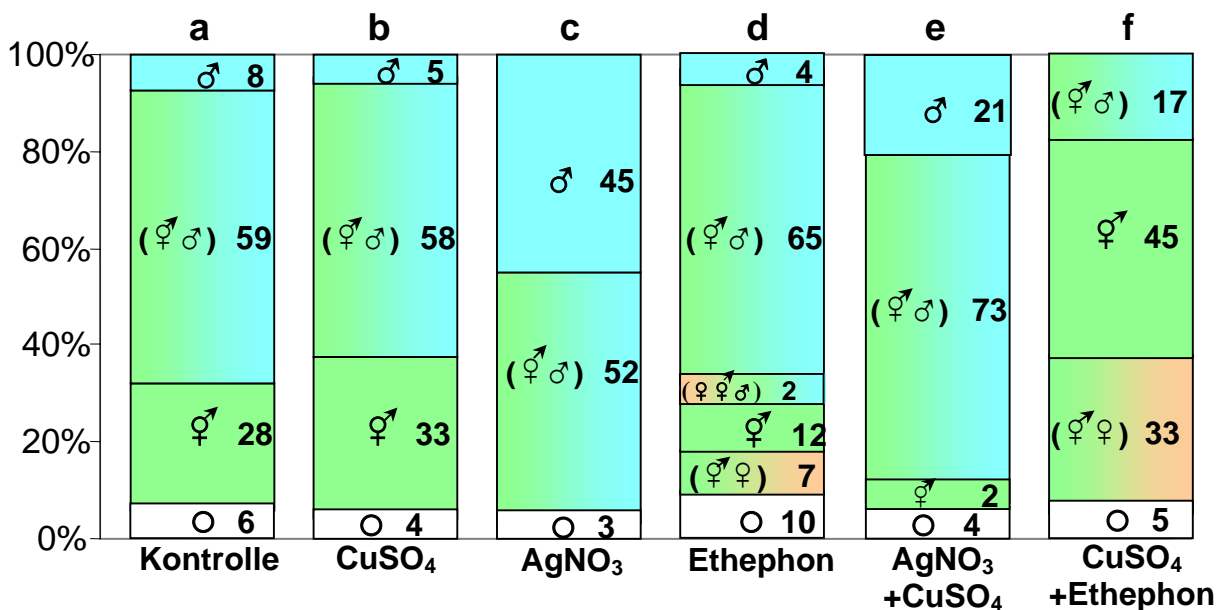


Abb. 2.15: Prozentuale Nodienzahl entsprechend ihrer Geschlechtsausprägung bei hermaphroditischen Pflanzen nach der Behandlung mit CuSO₄, AgNO₃ und Ethephon; ○ = keine Blüten; Boniturdaten siehe Anhang 7.3.1.

So bilden 33% der Nodien nach der Kombinationsbehandlung von Ethephon und CuSO_4 weibliche Blüten aus. Im Gegensatz dazu führte die ausschließliche Behandlung mit Ethephon zur Ausbildung von 9% Nodien ($7\% \text{♀} \text{♂} + 2\% \text{♀} \text{♀} \text{♂}$) mit weiblichen Blüten (Abb. 2.15 d und f). Außerdem zeigten die hermaphroditischen Geschlechtstypen nach der Kombinationsbehandlung mit Ethephon und CuSO_4 45% rein hermaphroditische Nodien. Im Vergleich hierzu entwickelten die Kontrollpflanzen lediglich 12% und die Ethephon behandelten 13% rein hermaphroditische Nodien (Abb. 2.15 a und f).

Die Untersuchungen zur Wirkungsweise des CuSO_4 zeigten, dass bei allen Versuchspflanzen die Wirkung von AgNO_3 durch CuSO_4 zumindest teilweise aufgehoben wird (vgl. jeweils c und e in Abb. 2.13, 2.14 und 2.15).

Außerdem wurde eine mögliche direkte oder indirekte Wirkung des Kupfers bei der Geschlechtsdetermination der Gurke bei den hermaphroditischen Linien mittels Kombinationsbehandlung von Ethephon und CuSO_4 und der daraus resultierenden Erhöhung der Weiblichkeit nachgewiesen (Abb. 2.15 a, d und f).

2.3.4 Physiologische Reaktionen auf AgNO_3 - und Gibberellin-Applikationen bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien

Die AgNO_3 Behandlung der gynözischen Versuchspflanzen zeigte in Abhängigkeit vom Alter der behandelten Pflanzen eine unterschiedliche Wirkung. So wurde nach der Behandlung im Zweiblattstadium ein Anteil von 24% rein männlicher Nodien und ein Anteil von 8% Nodien mit weiblichen und männlichen Blüten beobachtet (Abb. 2.16 a und b).

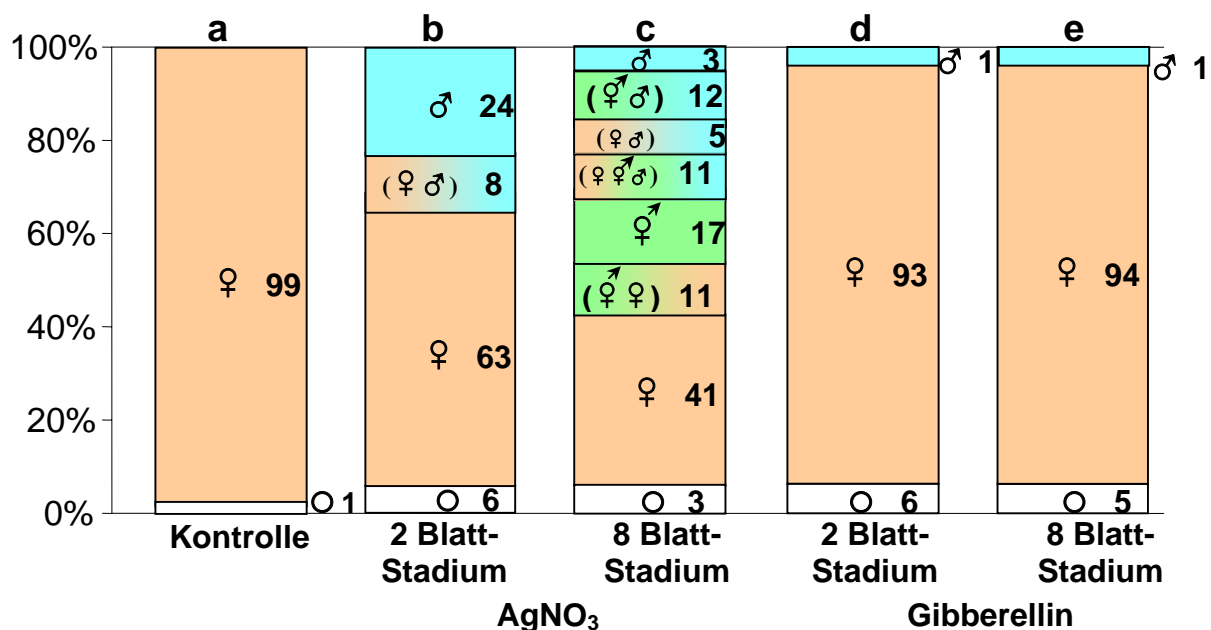


Abb. 2.16: Prozentuale Nodienzahl entsprechend ihrer Geschlechtsausprägung bei gynözischen Pflanzen nach der Behandlung mit AgNO_3 und Gibberellin in zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien; ○= keine Blüten; Boniturdaten siehe Anhang 7.3.2; Tab. 7.13 bis 7.22.

Erfolgte die AgNO_3 Behandlung jedoch im Achtblattstadium, entwickelten die Versuchspflanzen bei 51% der Nodien hermaphroditische Blüten (Abb. 2.16 c). Der Anteil von 3% rein männlich blühender Nodien nach der Behandlung im Achtblattstadium war geringer als der Anteil nach der frühen Behandlung im Zweiblattstadium (vgl. b und c in Abb. 2.16). Jedoch wurde insgesamt eine Erhöhung der Männlichkeit nach der AgNO_3 Behandlung im Stadium 2 beobachtet, da 60% der Nodien Blüten mit männlichen Geschlechtsorganen besaßen. Im Vergleich dazu lag der Anteil der männlichen Nodien nach der AgNO_3 Behandlung im Zweiblattstadium bei 32% (vgl. a, b und c in Abb. 2.16). Außerdem ist bemerkenswert, dass nur bei der Behandlung im Achtblattstadium hermaphroditische Blüten auftreten (Abb. 2.16 c).

Eine Gibberellin Applikation gynözischer Pflanzen führte sowohl im Stadium 1 als auch im Achtblattstadium jeweils zu 1% Nodien mit männlichen Blüten, so dass die Versuchspflanzen in beiden Entwicklungsstadien identisch reagierten (Abb. 2.16 d und e).

Die hermaphroditischen Pflanzen entwickelten nach einer frühen AgNO_3 Behandlung (Zweiblattstadium) an 12% der Nodien männliche und hermaphroditische Blüten und an 24% der Nodien nur männliche Blüten (Abb. 2.17 b). Erfolgt die Behandlung nach acht ausgebildeten Blättern, erhöht sich der Anteil der rein männlich blühenden Nodien auf 43%. Auch der Anteil von männlich und hermaphroditisch blühenden Nodien erhöhte sich auf 35 % (vgl. b und c in Abb. 2.17).

Erfolgt eine Gibberellin Behandlung der hermaphroditischen Pflanzen im Zweiblattstadium wurde keine Wirkung beobachtet (vgl. a und d in Abb. 2.18). Bei Durchführung einer Gibberellin Behandlung im Achtblattstadium wurde jedoch eine Erhöhung der rein männlichen Nodien (14%) und eine Reduzierung der rein hermaphroditischen Nodien auf 54% beobachtet (vgl. a, d und e in Abb. 2.17).

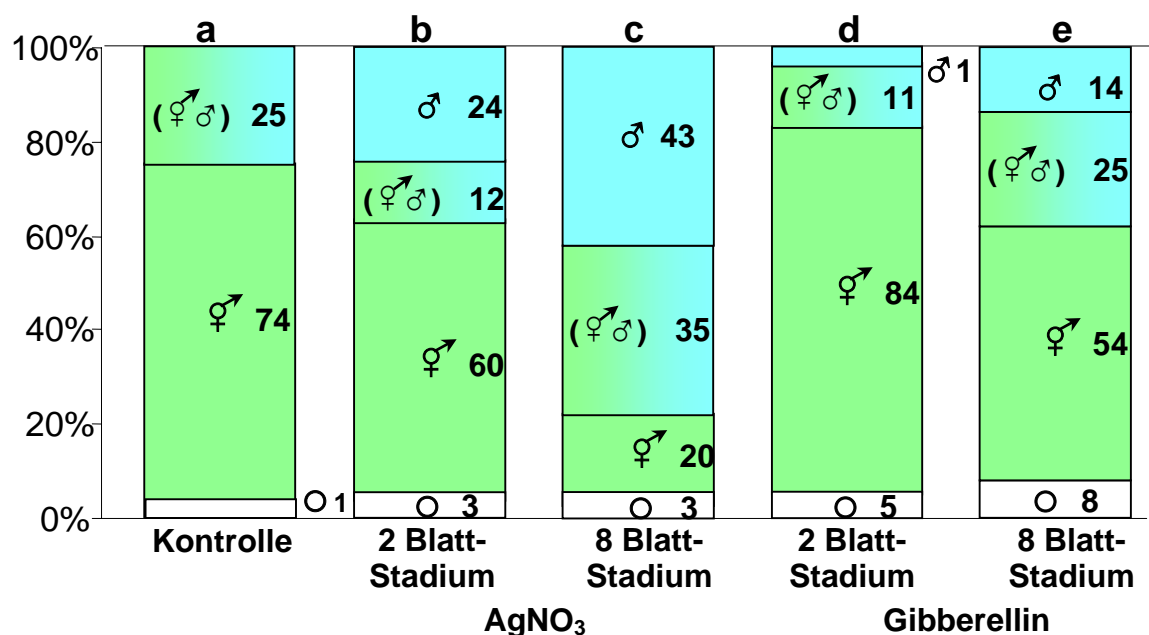


Abb. 2.17: Prozentuale Nodienzahl entsprechend ihrer Geschlechtsausprägung bei hermaphroditischen Pflanzen nach der Behandlung mit AgNO_3 und Gibberellin in zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien; Boniturdaten siehe Anhang 7.3.2; Tab. 7.13 bis 7.22.

Bei den vorliegenden Applikationsversuchen von unterschiedlich entwickelten Versuchspflanzen wurde der Nachweis erbracht, dass sowohl die hermaphroditischen als auch die gynözischen Pflanzen auf eine AgNO_3 Behandlung im Achtblattstadium sensibler reagierten als im Zweiblattstadium (vgl. a, b und c in Abb. 2.16 und 2.17). Dieser Effekt wurde auch bei den hermaphroditischen Pflanzen bei der Gibberellin Behandlung nachgewiesen (vgl. Abb. 2.16 und Abb. 2.17).

2.3.5 Physiologische Reaktion gynözischer Geschlechtstypen nach einer 1-MCP Behandlung

Nach der 1-MCP Behandlung im $\frac{1}{2}$ und $1\frac{1}{2}$ Blattstadium zeigte sich bei den gynözischen Pflanzen keine Induktion von männlichen Blüten. Erfolgte die Behandlung jedoch im $2\frac{1}{2}$ und $3\frac{1}{2}$ Blattstadium, entwickelten die Versuchspflanzen 10% männliche Nodien. Außerdem wurden bei 4% der Nodien männliche und weibliche Blüten beobachtet. Erfolgte die erste 1-MCP Behandlung im $4\frac{1}{2}$ und 8 Blattstadium entwickelten sich 1% rein männliche Nodien. Diese Versuchspflanzen entwickelten jedoch 10% gemischt blühende Nodien mit männlichen und weiblichen Blüten. Mit 1% gemischt blühenden (männlich und weibliche) Nodien zeigt die Behandlung im Stadium 8 und $11\frac{1}{2}$ Blattstadium nur noch eine geringe Wirkung.

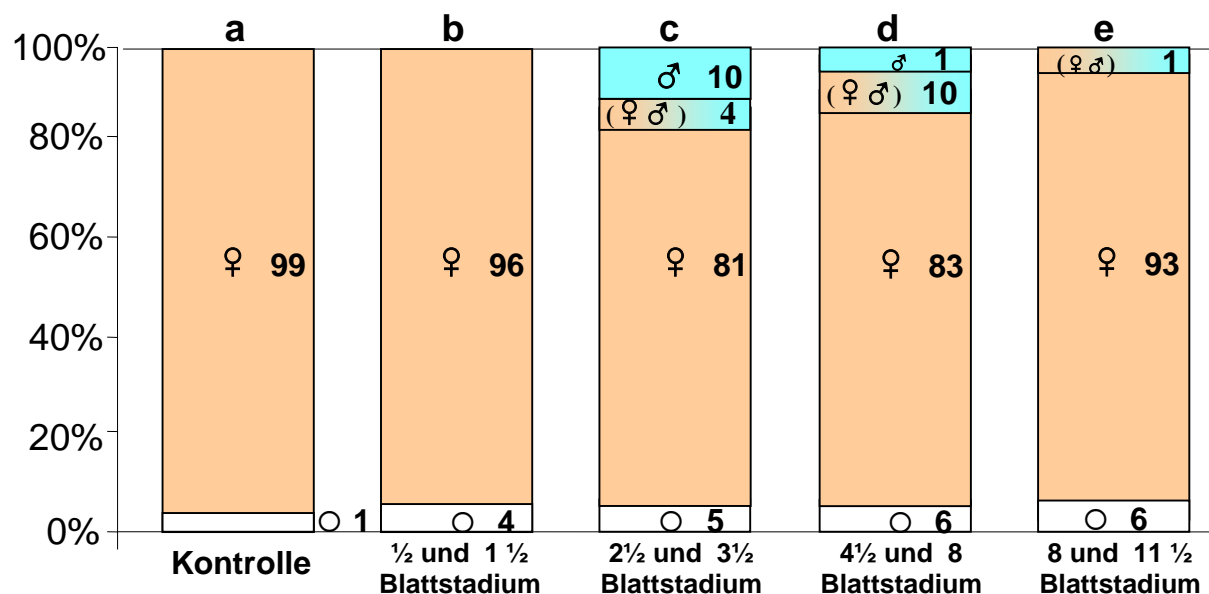


Abb. 2.18: Prozentuale Nodienzahl entsprechend ihrer Geschlechtsausprägung bei gynözischen Pflanzen nach der Behandlung mit 1-MCP in unterschiedlichen Entwicklungsstadien; ○ = keine Blüten
 a, b und c : Behandlung von Pflanzen der genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD
 d und e : Behandlung von Pflanzen des genetischen Hintergründe WrD
 Boniturdaten siehe Anhang 7.3.2, Tab.7.13, 7.23 bis 7.26.

2.4 Diskussion

2.4.1 Das Pflanzenmaterial

Gurkenpflanzen entwickeln bei optimalen Kulturbedingungen jeden Tag ein bis zwei Nodien. Um dieses schnelle Wachstum zu ermöglichen, benötigen sie eine hohe Stoffwechselaktivität, die zu einer sofortigen physiologischen Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen führt. Die Geschlechtsdetermination erfolgt im Verlauf der gesamten Lebensdauer in der neu entstehenden Sprossspitze. Folglich ist der Geschlechtsdeterminationsmechanismus in jedem Entwicklungsstadium der Pflanze aktiv und beeinflussbar.

Dank der hohen Wachstumsrate wird auch eine schnelle Generationszeit möglich, die bei bis zu drei Generationen im Jahr liegen kann. So sind auch klassisch genetische Kreuzungsanalysen in einem überschaubaren Zeitrahmen durchzuführen. Ein weiterer Vorteil ist die lange Keimfähigkeit, die bei ca. 10 Jahren liegt.

Das aus dem Rückkreuzungsprogramm (siehe Abb. 2.7 in Kapitel 2.2.1.1 und Abb. 3.2 in Kapitel 3.2.1) entnommene nahe isogene Pflanzenmaterial war besonders für die Durchführung der physiologischen Untersuchungen von großem Vorteil. Bei diesen Linien, die sich nur bezüglich des *M/m*- bzw. des *Acr/acr*- Gens unterscheiden, ist der genetische Hintergrund und damit auch der genetische Einfluss auf die Geschlechtsausprägung weitgehend identisch. So ist davon auszugehen, dass sowohl bei den Pfropfungsversuchen als auch bei den Behandlungsversuchen die beobachteten Effekte zum größten Teil auf die geschlechtsdeterminierenden Gene (*Acr/acr* und *M/m*) zurückzuführen sind. Das der genetische Hintergrund einen großen Einfluss auf die Geschlechtsdetermination hat, zeigen die häufig widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse, bei denen keine nahe isogenen Linien bzw. verschiedene genetische Herkünfte verwendet wurden. So zeigen zum Beispiel die Tageslänge und die Temperatur bei unterschiedlichen Herkünften entgegengesetzte Reaktionen (CANTLIFFE 1981; LOWER 1975; TAKAHASHI et al. 1983; LOWER und EDWARDS 1986). Auch Messungen von endogenen Hormonkonzentrationen bei unterschiedlichen Geschlechtstypen ergaben zum Teil widersprüchliche Ergebnisse, wenn kein nahe isogenes Pflanzenmaterial verwendet wurde (ATSMON 1968; ATSMON et al. 1968; FRANKELN und GALUN 1977).

Bei der Durchführung der Pfropfungsversuche führte der determinierte Wuchs (siehe Kapitel 2.2.1.1) des verwendeten Pflanzenmaterials zu Problemen. So determinierte die Sprossspitze nach der Pfropfung der Versuchspflanzen teilweise bevor ein Einfluss auf die Geschlechtsausprägung zu beobachten war, so dass diese Pfropfungen nicht ausgewertet werden konnten. Dieser Effekt zeigte sich insbesondere bei den Pfropfungen zwischen phänotypisch andrözischen und gynözischen Pflanzen.

Da Kulturbedingungen mit einer Tag/Nacht- Temperaturdifferenz von mindestens 6°C und 16h Zusatzlicht eine spätere Determination zeigten, erfolgten die Pfropfungen unter diesen Umweltbedingungen.

Aufgrund des determinierten Wuchses ist auch eine vegetative Vermehrung des Pflanzenmaterials nicht möglich. So konnte durch die Verklonung der Pflanzen der eingeleitete Wachstumsstillstand nicht revidiert werden, so dass die Stecklinge wenige Tage nach der Bewurzelung einen terminalen Blütenstand entwickelten. Folglich konnten diese Pflanzen sowohl für Chemikalien Behandlungen als auch für Pfropfungsversuche nicht verwendet werden.

Durch eine Nutzung von Klonteilen, insbesondere bei Pfropfungsversuchen, könnten jedoch noch bestehende Effekte durch aufspaltende Gene innerhalb der Linien ausgeschlossen werden. Gegen den Einsatz von verklonten Versuchspflanzen spricht, dass mögliche Unterschiede des genetischen Hintergrundes zwischen den Linien durch den Einsatz eines einzigen Genotyps verstärkt werden. Dieser Effekt kann jedoch aufgrund der hohen Isogenität des Pflanzenmaterials weitgehend ausgeschlossen werden.

Dass innerhalb der Linien Gene aufspalten, die einen Einfluss auf die Geschlechtsausprägung haben, ist aufgrund von unterschiedlichen Reaktionen der phänotypisch andrözischen Sprossspitze nach der Pfropfungen auf eine gynözische Wurzel zu vermuten (siehe Kapitel 2.3.2; Abb. 2.12). Dieser Einfluss, der sich im Grad der Weiblichkeit zeigt, könnte durch ein aufspaltendes Gen in der phänotypisch andrözischen oder der gynözischen Linie erklärt werden. Trotz über Jahrzehnte durchgeführte Selbstungen bzw. Rückkreuzungen und damit weitgehende Homozygotie der gynözischen und phänotypisch andrözischen Linien, sind aufspaltende Gene nicht vollkommen auszuschließen.

Da durch das homozygot rezessive Gen *De/de* (detereminierter Wuchs) die Ausprägung des *A/a* Gens nicht beobachtet werden kann, ist eine Differenzierung von monözischen (*dede MM acracr A.*) und andrözischen (*dede MM acracr A.*) Genotypen nicht möglich (FRANKEN 1979). Folglich könnte in der für die Pfropfungen verwendeten phänotypisch rein andrözischen Nachkommenschaft das *A/a* Gen ohne erkennbaren Einfluss auf den Phänotyp aufspalten.

Durch die Wirkung der gynözischen Wurzel (*MM AcrAcr*) auf die andrözische Sprossspitze könnte jedoch durch die Vorverlegung der weibliche Blütenphase die Aufspaltung des *A/a* Gens sichtbar werden. Das *A/a* Gen verstärkt im rezessiven Zustand die männliche Ausprägung und ist vollständig dominant (KUBICKI 1969d/e), so dass eine Nachkommenschaft, die aus einer Selbstung entstanden ist, eine 1:3 Aufspaltung (andrözisch (*acracr aa*) zu monözisch (*acracr A.*)) erwarten lässt. Die mögliche Aufspaltung, die bei der Reaktion der phänotypisch andrözischen Sprossspitze zu beobachten war, ist jedoch nur mit einer 3:1 Aufspaltung (3 andrözisch: 1 monözisch) zu erklären (χ^2 Wert = 1,72) (siehe Kapitel 2.3.2; Abb. 2.12). Aufgrund dieser Ergebnisse muss ein weiteres geschlechtsbeeinflussendes Gen, das im dominanten Zustand die Männlichkeit fördert, aufspalten. Da sich bei den Kreuzungsanalysen ähnliche Ergebnisse zeigten, werden weitere Aspekte der Auswirkungen

des genetischen Hintergrundes auf die Geschlechtsausprägung in Kapitel 3 diskutiert (siehe Kapitel 3.4.2).

2.4.2 Beurteilung der physiologischen Untersuchungsmethoden

Die Auswahl der Untersuchungsmethode zur Funktionsanalyse eines Gens ist abhängig vom untersuchten Merkmal. Folglich muss zunächst geklärt werden, ob die Ausprägung des betrachteten Gens dominant/rezessiv oder intermediär erfolgt, ob sich das Gen umweltstabil ausprägt, und inwieweit Wechselwirkungen mit weiteren Genen die Merkmalsausprägung beeinflussen. Alle diese grundlegenden Fragen konnten für die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden Gene *Acr/acr* und *M/m* in den letzten Jahrzehnten größtenteils beantwortet werden (siehe Kapitel 2.1.)

Die Funktion des *Acr/acr* Gens ist weitgehend aufgeklärt (siehe Kapitel 3). Es führt im dominanten Zustand zu einer erhöhten Ethylenkonzentration und kodiert wahrscheinlich für eine ACC Synthase (Schlüsselenzym für die Ethylensynthese) (TREBITSH et al. 1997). Weiterhin wurde in gynözischen Linien (*MM AcrAcr*) eine erhöhte ACC Konzentration (Produkt der ACC Synthase) nachgewiesen (siehe Abb. 2.4, Kapitel 2.1.6). Durch Pfropfungsversuche gelang es FRIEDLANDER et al. (1977b) eine Beeinflussung von gynözischen Wurzeln (*MM AcrAcr*) auf die Blütenausprägung von monözischen Sprossspitzen (*MM acracr AA*) nachzuweisen. Ferner konnte gezeigt werden, dass das ACC im Xylem transportiert wird (ELESE et al. 1993). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist zu vermuten, dass durch den Xylemtransport des ACC's eine erhöhte Weiblichkeit bei der phänotypisch andrözischen Sprossspitze beobachtet werden kann, wenn diese auf eine gynözische Wurzel gepfropft wurde (weiteres zur molekulargenetischen Funktion des *Acr/acr* Gens siehe Kapitel 3). In welchem Ausmaß dieser Einfluss jedoch bei dem verwendeten Pflanzenmaterial im Zusammenhang mit den entsprechenden Kulturbedingungen zu beobachten ist, sollte durch Pfropfungsversuche zwischen phänotypisch andrözischen und gynözischen Linien aufgeklärt werden. Die durch diese Pfropfungen erhaltenen Resultate sind bei der Beurteilung der Pfropfungen zur Aufklärung der Wirkungsweise des *M/m* Gens zwischen hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) und gynözischen (*MM AcrAcr*) Linien von entscheidender Bedeutung (siehe Kapitel 2.4.3).

Über die physiologische Wirkung des *M/m* Gens existieren bis heute lediglich theoretische Überlegungen (siehe folgendes Kapitel 2.4.3). Da die Funktion des *M/m*-Gen-Produktes wahrscheinlich in direkter Abhängigkeit zur Ethylenkonzentration und damit zum *Acr/acr* Gen steht, muss die Funktion bzw. Ausprägung des *Acr/acr* Gens und alle Faktoren, die die Ethylensynthese bzw. die Ethylenaktivität beeinflussen (weiteres siehe Kapitel 2.1.6, Abb.

2.4), bei der Durchführung und Auswertung der Untersuchungsergebnisse berücksichtigt werden.

Aufgrund dieser Einflussmöglichkeiten der Ethylenkonzentration auf die Geschlechtsausprägung war es notwendig, alle Versuchspflanzen unter kontrollierten Umweltbedingungen zu kultivieren. Dass unterschiedliche Temperaturen einen entscheidenden Einfluss auf die Geschlechtsausprägung haben können, zeigt sich durch den Vergleich der hermaphroditischen Kontrollpflanzen der unterschiedlichen Behandlungsversuche (Kapitel 2.2.1.2). So entwickeln die hermaphroditischen Kontrollpflanzen bei einer T/N-Temperatur von 28°/24°C ca. 67% Nodien mit männlichen Blüten (Kapitel 2.3.3, Abb. 2.15a), bei Temperaturen von 24°/18° C (T/N) werden jedoch lediglich 24% ausgebildet (Kapitel 2.3.4 Abb. 2.17a). Diese Tendenz zur Männlichkeit bei hohen Temperaturen wurde bereits von anderen Autoren beschrieben und auch in Kapitel 2.1.5 erörtert.

Ein weiteres Beispiel für die Beeinflussung der Ethylensynthese ist der durch Pathogene verursachte biotische Stress (zusammengefasst in ABELES 1992). Das verwendete Pflanzenmaterial ist aufgrund der starken Inzucht sehr anfällig gegenüber Mehltau, so dass versucht werden musste, den Befall durch eine Schwefeldioxydbegasung zu verhindern, da diese keinen Einfluss auf die Geschlechtsausprägung zeigte. Pestizide hingegen können Chemikalien enthalten, die durch die Beeinflussung des Phytohormonhaushalts einen Effekt auf die Geschlechtsausprägung haben können. So enthalten zum Beispiel einige Fungizide Kupfer (Einfluss von Kupfer auf die Geschlechtsdetermination, siehe Kapitel 2.4.3).

Aufgrund dieser Einflüsse durch äußere Bedingungen ist die genaue Auswertung der Kontrollpflanzen bei allen physiologischen Untersuchungen von besonderer Bedeutung.

Bei den Pfropfungsversuchen wurde neben äußeren Einflüssen ein weiterer Effekt bei den Kontrollpflanzen beobachtet. So zeigten sich einige weibliche Blüten bei den phänotypisch andrözischen Kontrollpfropfungen (siehe Tab. 2.6 in Kapitel 2.3.2). Dieser Effekt ist durch eine Stimulation der Ethylensynthese nach der Verletzung der Versuchspflanzen zu erklären (SHIOMI et al. 1998).

Die Beeinflussung der physiologischen Prozesse innerhalb der Pflanze ist bei Behandlungen mit Phytohormonen und deren inhibierenden oder stimulierenden Chemikalien aufgrund der komplexen Wechselwirkungen zwischen den Hormonen, nicht auszuschließen (ROSS und O'NEIL 2001, KOVTUN et al. 1998). Diese Wechselwirkungen führen durch die multiple Wirkungsweise der Phytohormone zu mehreren physiologischen Reaktionen der Versuchspflanzen. Daher ist es problematisch abzuschätzen, ob die eingesetzten Chemikalien und Phytohormone direkt oder indirekt auf die Geschlechtsdetermination wirken.

Eine weitere physiologische Methode ist der Vergleich der endogenen Hormonkonzentration bei den unterschiedlichen Geschlechtstypen. Diese Methode hat den Vorteil, dass der

Phytohormonhaushalt der Versuchspflanzen nicht beeinflusst wird. Jedoch kann der genetische Hintergrund der Geschlechtstypen einen messbaren Einfluss auf die Hormonkonzentration haben, so dass isogene Linien verwendet werden sollten. Bei den meisten veröffentlichten Ergebnissen wurde diese Voraussetzung nicht erfüllt, so dass häufig von widersprüchlichen Ergebnissen berichtet wurde (WITTWER und BUCOVAC 1962; CLARK und KENNEY 1969; FRIEDLANDER et al. 1977a; ATSMON und TABBAK 1979).

Da die Funktion des *M/m* Gens bestimmt werden sollte und dieses Gen wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Konzentration der Phytohormone hat, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine endogenen Hormonmessungen durchgeführt.

Generell muss jedoch bei der Durchführung von physiologischen Untersuchungen mit einer Variabilität der Geschlechtsausprägung durch die beschriebenen Einflüsse gerechnet werden. Ein Teil dieser Abweichungen konnte aufgrund der Verwendung der isogenen Linien (WrD, ED und ECD) ausgeschlossen werden. Jedoch sollten bei der Beurteilung der Ergebnisse des vorliegenden Kapitels nur grundlegende bzw. eindeutige Veränderungen der Blütenausprägung für die Aufklärung der Funktion der geschlechtsdeterminierenden Gene verwendet werden.

2.4.3 Neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise des männlichkeitsinhibierenden Faktors, das *M/m* Gen

Die Ergebnisse der Pfropfungsversuche zwischen den gynözischen (*MM AcrAcr*) und hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Linien zeigten keinen Einfluss der gynözischen Wurzel auf die hermaphroditische Sprossspitze. Hingegen konnte für das *Acr/acr* Gen ein Transport der Folgeprodukte durch die Pfropfung zwischen phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) und gynözischen Wurzeln nachgewiesen werden (siehe Tab. 2.6 a,b, Kapitel 2.3.2).

Damit ist eine ausschließliche Expression des *M/m* Gens in der Wurzel und ein anschließender Transport der Folgeprodukte auszuschließen, so dass die Expression sehr lokal im Blütenmeristem erfolgen muss. Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen von homeotischen Blütenmutanten bei der Gurke bestätigt (KATER et al. 2001) (Abb.2.3 in Kapitel 2.1.2). Die Untersuchung von MADS-Box-Mutationen zeigte, dass die A-Funktionsmutanten in den weiblichen Blüten Stamina im zweiten Wirtel entwickeln können. Folglich ist zu vermuten, dass männlichkeitsinhibierende Gene (z.B. das *M/m* Gen) im zweiten Wirtel der weiblichen Blüte nicht exprimiert werden.

Im dritten Wirtel der Blüte, in dem der hermaphroditische Wildtyp normalerweise Stamina entwickelt, wird beim gynözischen Wildtyp und bei allen Funktionsmutaten die Ausbildung von generativen Blütenorganen unterdrückt (Abb.2.3 in Kapitel 2.1.2). Diese sehr lokale

Wirkung ist nur durch eine lokale Expression des *M/m* Gens zu erklären, so dass die Expression des *M/m* Gens höchstwahrscheinlich auf den dritten Wirtel beschränkt ist.

Dennoch bleiben einige Fragen über den Expressionsort des *M/m* Gens unbeantwortet. Folglich muss geklärt werden, ob das *M/m* Gen neben der Unterdrückung der Stamina in weiblichen Blüten noch weitere physiologische Auswirkungen innerhalb der Pflanze hat.

Wenn das *M/m* Gen die Sensitivität eines Ethylenrezeptors beeinflusst, wie es bei der Ein-Hormonhypothese postuliert wird (weiteres siehe Abb. 2.6, Kapitel 2.1.6), ist eine unterschiedliche Ethylensensitivität zwischen hermaphroditischen und gynözischen Geschlechtstypen zu vermuten. Um dies aufzuklären, wurde das Längenwachstum der hermaphroditischen und gynözischen Geschlechtstypen miteinander verglichen. Aufgrund der multiplen Wirkung des Ethylens führt es außerdem zu einer Verkürzung der Internodien (Kapitel 2.1.4). Folglich sollten bei den gynözischen Geschlechtstypen (hohe Ethylensensitivität) kürzere Internodien zu beobachten sein als bei den hermaphroditischen (geringe Ethylensensitivität). Durch Internodienmessungen wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den isogen gynözischen und hermaphroditischen Linien nachgewiesen werden (siehe Tab. 2.4; Kapitel 2.3.1). Damit ist zu vermuten, dass sich die Veränderung der Ethylensensitivität, die zu weiblichen bzw. zwittrigen Blüten führt, auf die Blüten beschränkt ist.

Im Gegensatz zur Wirkung des *M/m* Gens wurde jedoch ein signifikanter Unterschied der Internodienlänge bei phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Linien im Vergleich zu gynözischen (*MM AcrAcr*) Linien und damit in Abhängigkeit vom *Acr/acr* Gen nachgewiesen. So zeigten die phänotypisch andrözischen Linien aufgrund der niedrigeren Ethylenkonzentration eine geringere Stauchung (siehe Tab. 2.3; Kapitel 2.3.1). Dieser Effekt des *Acr/acr* Gens auf die Internodienlänge wurde bereits von ATSMON (1968) beschrieben.

Da das verwendete Pflanzenmaterial einen determinierten Wuchs zeigt (Kapitel 2.2.1.1) und dieser einen Einfluss auf die Internodienlänge hat, kann eine Überlagerung der Wirkung des *M/m* Gens durch den determinierten Wuchs nicht ausgeschlossen werden.

Um die Wirkung des *M/m* Gens auf das Pflanzenwachstum zu untersuchen, wurden auch von YAMASAKI et al. (2001) bei nicht determinierten monözischen (*MM acracr*) und andromonözischen (*mm acracr*) Geschlechtstypen Hypokotylmessungen nach Ethylenbehandlungen durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen zeigten die andromonözischen Jungpflanzen eine geringere Wachstumshemmung als die monözischen und damit eine abgeschwächte Reaktion auf die Ethylenbehandlung (YAMASAKI et al. 2001). Da jedoch für diese Untersuchungen keine isogenen Linien verwendet wurden, könnte dieser Effekt durch den genetischen Hintergrund verursacht worden sein.

Den Untersuchungsergebnissen der letzten Jahre zur Folge wirkt das *M/m* Gen ausgesprochen spezifisch im dritten Wirtel des Blütenmeristems. Damit ist eine Wirkung auf der Ebene der Gesamtpflanze, wie bei dem *Acr/acr* Gen, unwahrscheinlich. Jedoch ist nicht auszuschließen,

dass die Expression des *M/m* Gens auch in anderen Organen der Pflanze erfolgt, ein Transport des Produktes bzw. der Folgeprodukte zum eigentlichen Wirkungsort (das Blütenmeristem) jedoch unterbleibt.

Zur Aufklärung der physiologischen Funktion des *M/m* Gen wurden unterschiedliche Geschlechtstypen mit CuSO_4 , AgNO_3 , Ethephon und Gibberellin behandelt (siehe Kapitel 2.2.4, 2.2.5 und 2.2.6).

Untersuchungen von RODRIGUEZ et al. (1999) zeigen, dass Ethylenrezeptoren für die Bindung mit Ethylen ein Cu^+ -Inon als Kofaktor benötigen. In der Ein-Hormonhypothese werden Ethylenrezeptoren sowohl für die Förderung der Weiblichkeit als auch für die Unterdrückung der Männlichkeit (*M/m* Gen) postuliert (siehe Kapitel 2.1.6, Abb. 2.6). Folglich könnte durch eine Kupferbehandlung die Erhöhung der Sensitivität der bei der Geschlechtsdetermination beteiligten Ethylenrezeptoren vermutet werden.

Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass keine geringere Sensitivität des vermuteten Ethylenrezeptors (siehe Ein-Hormonhypothese, Abb. 2.6) durch Kupfermangel vorliegt. So führte eine Kupfersulfatbehandlung (CuSO_4) zu keiner Förderung der rein weiblichen Blüten bzw. Unterdrückung der Stamina (siehe Kapitel 2.3.3; Abb. 2.13; 2.14 und 2.15 jeweils a) und b). Wenn das *M/m* Gen für einen Ethylenrezeptor kodiert und zwischen den Allelen ein funktioneller Unterschied vorliegt, besteht dieser Unterschied wahrscheinlich nicht bei der Bindung des Kofaktors (Cu^+) (siehe Kapitel 4.1.2.1 und RODRIGUEZ et al. 1999).

Das Kupfersulfat zeigte jedoch bei der Geschlechtsausprägung der gynözischen Linien eine eindeutige antagonistische Wirkung zum Silbernitrat (siehe Kapitel 2.3.3 und vgl. jeweils c und e in Abb. 2.13). Folglich ist zu vermuten, dass die Ag^+ - und Cu^+ - Ionen das gleiche physiologische Element der Geschlechtsdetermination beeinflussen. Da sich nach einer Cu^+ -Behandlung hermaphroditischer Geschlechtstypen (*mm AcrAcr*) keine rein weiblichen Blüten entwickelten (siehe Abb. 2.15 jeweils a und b), könnte eine nur indirekte Beeinflussung des *M/m* Gen Produktes durch Cu^+ und Ag^+ -Inonen vermutet werden. Die Ergebnisse könnten jedoch auch erklärt werden, wenn das rezessive *m* Gen nicht expremiert wird. Folglich könnte das Produkt des rezessiven *m* Gens nicht durch eine Cu^+ - Behandlung beeinflusst werden. Weitere Untersuchungsergebnisse (s. o.) lassen jedoch eine Restfunktion und damit eine Expression des rezessiven *m* Gens vermuten.

Die antagonistische Wirkung von AgNO_3 und CuSO_4 ist bei den hermaphroditischen Genotypen nicht vollständig, so dass es zu einer Erhöhung der Männlichkeit im Vergleich zu den Kontrollpflanzen kommt (siehe Abb. 2.15). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Reaktion ist, dass die Wirkung der Ag^+ - und der Cu^+ - Ionen auf den männlichkeitsinhibierenden Faktor eine direktere Wirkung ausüben als auf den weiblichkeitsfördernden Faktor (siehe Ein-Hormonhypothese, Abb. 2.6).

Diese unterschiedliche Wirkung auf beide geschlechtsdeterminierende Faktoren wurde auch bei der AgNO_3 Behandlung der gynözischen Linien beobachtet. So entstanden bei einer AgNO_3 behandelten gynözischen Pflanze zunächst zwittrige und erst dann männliche Blüten (siehe Abb. 2.13 in Kapitel 2.3.3). Diese Reaktion der Blütendetermination deutet darauf hin, dass der männlichkeitsinhibierende und der weiblichkeitsfördernde Faktor auf unterschiedlichen Ebenen der Ethylensignaltransduktion wirken, da der inhibierende männliche Faktor schneller deaktiviert wird (>zwittrige Blüten) als der fördernde weibliche Faktor (>männliche Blüten).

Das Gibberellin (GA), das die Ethylenaktivität einschränkt und dadurch antagonistische Wirkung zum Ethylen zeigt, hemmt beide geschlechtsdeterminierende Faktoren gleichzeitig, da ein direkter Wechsel von weiblichen zu männlichen Blüten zu beobachten ist (KALLO und FRANKEN 1978). So muss vermutet werden, dass das GA im Gegensatz zum AgNO_3 in der Geschlechtsdeterminationskette nach den beiden geschlechtsdeterminierenden Faktoren seine hemmende Wirkung zeigt (weiteres zur GA Wirkung siehe unten).

Aufgrund der Reaktion der Versuchspflanzen auf eine Kombinationsbehandlung mit Ethephon und CuSO_4 konnten weitere Informationen zur Funktion des *M/m* Gens erhalten werden.

Phänotypisch andrözische (*MM acracr*) Pflanzen entwickeln nach einer Ethephonbehandlung 95% Nodien mit weiblichen Blüten, hermaphroditische (*mm AcrAcr*) Linien hingegen zeigen bei identischer Ethephonbehandlung lediglich 8% Nodien mit weiblichen Blüten. Diese unterschiedliche Reaktion auf Ethylen könnte durch eine verringerte Reaktionsfähigkeit des *m* Allel Produktes zurückzuführen sein. Aufgrund dieser eingeschränkten Ethylensensitivität führt nur eine hohe Ethylenkonzentration zur Unterdrückung der Stamina und damit zu weiblichen Blüten. Dieses Ergebnis wird durch die Applikationsversuche von andromonözischen Linien bestätigt (YIN und QUINN 1995) und dient als Grundlage der Ein-Hormonhypothese. Damit ist das rezessive *M/m* Gen nicht wie von PERL-TREVES (1999) und YAMASAKI et al. (2001) vermutet wurde komplett funktionslos, da es auch bei hermaphroditischen Geschlechtstypen bei einer hohen Ethylenkonzentration zur Ausbildung von weiblichen Blüten kommt.

Die Annahme dieser Restfunktionsfähigkeit des *m* Allel Produktes wird auch durch die Kombinationsbehandlungen mit Ethephon und CuSO_4 bestätigt. So entwickelten hermaphroditische Linien nach einer Behandlung von Kupfersulfat und Ethephon 33% Nodien mit weiblichen Blüten. Wenn hingegen nur mit Ethephon behandelt wurde, entwickelten sich an 8% der Nodien weibliche Blüten und bei einer CuSO_4 Behandlung wurden keine weiblichen Blüten beobachtet (siehe Abb.2.15 vgl. a, d und f).

Durch die gleichzeitige Wirkung der hohen Ethylen- und Kupferkonzentration wird das ethyleninduzierte Signal wahrscheinlich so intensiv, dass auch das Produkt des rezessiven *M/m* Gens aktiviert wird.

Aufgrund der Applikationsversuche mit männlichkeitsinduzierenden Chemikalien (Gibberellin, AgNO_3 und 1-MCP) zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurde eine entwicklungsabhängige Wirkungsweise auf die Geschlechtsdetermination nachgewiesen (siehe Kapitel 2.3.4 und Kapitel 2.3.5). So zeigen die verschiedenen Chemikalien zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten abweichende Reaktionen der Blütendetermination. Das Gibberellin (GA_3) führte bei hermaphroditischen Linien, die in einem Achtblattstadium behandelt wurden, zu einer eindeutigen Reaktion. Hingegen zeigte die GA_3 Behandlung bei den gynözischen Pflanzen keine Reaktion (siehe Abb. 2.16d und Abb. 2.17d in Kapitel 2.3.4). Die Reaktion der hermaphroditischen Linie auf GA_3 kann lediglich Informationen über Wirkungsweise bzw. Inhibierung des weiblichkeitsfördernden Faktors liefern (siehe Ein-Hormonhypothese), da der männlichkeitsinhibierende Faktor durch den rezessiven Zustand des M/m Gens bei diesem Genotyp inaktiv ist.

Folglich kann aufgrund der Ergebnisse der GA_3 Behandlung vermutet werden, dass der weibliche Faktor im Achtblattstadium sensitiver auf das GA_3 reagiert als im Zweiblattstadium (Abb. 2.17e in Kapitel 2.3.4). Eine Beurteilung, welche Wirkung das GA_3 auf den männlichkeitsinhibierenden Faktor (M/m Gen) hat oder ob eine gleichzeitige Wirkung auf beide geschlechtsdeterminierende Faktoren besteht, ist aufgrund der Ergebnisse bei den gynözischen Pflanzen nicht möglich (siehe Abb. 2.16 und 2.17 in Kapitel 2.3.4). Vergleichbare Untersuchungen von KALLOO und FRANKEN (1978), bei denen gynözischen Linien der genetischen Hintergründe WrD und ECD in einem Zweiblattstadium mit 100 ppm GA_3 behandelt wurden, zeigten ebenfalls nur eine geringe bzw. keine Reaktion. Bei höheren GA_3 Konzentrationen (500 ppm und 1500 ppm) wurde jedoch ein eindeutiger Wechsel von weiblichen zu männlichen Blüten beobachtet. Behandlungen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen wurden jedoch nicht durchgeführt (KALLOO und FRANKEN 1978). Aufgrund dieser Ergebnisse von KALLOO und FRANKEN (1978) ist anzunehmen, dass die eingesetzte GA_3 Konzentration bei den Behandlungsversuchen der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 2.2.5) wahrscheinlich zu gering war. Bei weiteren Untersuchungen zur GA_n -Wirkung wurde von abweichenden Wirkungsintensitäten bei unterschiedlichen GA_n Varianten berichtet (CLARK und KENNEY 1969; FRIEDLANDER et al. 1977a), so dass wahrscheinlich die GA_3 Behandlung nur bei hohen Konzentrationen zu einer Reaktion bei gynözischen Linien geführt hätte. Applikationsversuche mit GA_4 und GA_7 (100 ppm) zeigten bei gynözischen Pflanzen im Zweiblatt- bzw. Achtblattstadium einen direkten Wechsel von weiblichen zu männlichen Blüten (ATSMON und TABBAK 1979). Da bei keiner dieser GA_n -Applikationen jedoch von zwittrigen Blüten berichtet wurde (WITTEWERT und BUCOVAC 1962; CLARK und KENNEY 1969; FRIEDLANDER et al. 1977a, YIN und QUINN 1995), ist von einer gleichzeitigen Wirkung des GA_n auf beide geschlechtsdeterminierenden Faktoren zu jeder Entwicklungsstufe auszugehen.

Die 1-MCP Behandlung führt nur im Dreiblattstadium zur Ausprägung von rein männlichen Nodien. Erfolgt die Behandlung zu einem frühen (Einblattstadium) bzw. einem späten

Stadium (Zehnblattstadium), zeigt sie keine Reaktion. Die Wirkung des 1-MCP ist der Wirkung des Gibberellins sehr ähnlich, da nach der 1-MCP Behandlung ein direkter Wechsel von weiblichen zu männlichen Blüten erfolgt ohne dass zwittrige Blüten entstehen. Das 1-MCP ist jedoch zur Induktion von männlichen Blüten bei gynözisch x gynözisch Kreuzungen in der Praxis nur begrenzt einsetzbar, da der Entwicklungszeitpunkt der zu behandelnden Pflanzen sehr genau eingehalten werden muss, um eine für Kreuzungen notwendige Anzahl von männlichen Blüten zu induzieren. Weiterhin ist aufgrund des gasförmigen Zustandes das 1-MCP in der Handhabung problematisch (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.6) und schließt einen Einsatz im Freiland aus. Aufgrund dieser Eigenschaften kann das 1-MCP die Ag^+ -Verbindungen (z.B. AgNO_3) in der Pflanzenzüchtung nicht ersetzen.

Eine AgNO_3 Behandlung induziert im Zweiblattstadium einen direkten Wechsel von weiblichen zu männlichen Blüten. Erfolgte die AgNO_3 Behandlung jedoch im Achtblattstadium, entwickelten sich erst hermaphroditische und dann männliche Blüten (siehe Abb. 16 in Kapitel 2.3.5). Demzufolge kann vermutet werden, dass zunächst der männliche Faktor (hermaphroditische Blüten) und dann der weibliche Faktor inhibiert wurde. Applikationsversuche von ATSMON und TABBAK (1979), bei denen gynözische Pflanzen mit gleicher AgNO_3 Konzentration zu identischen Entwicklungsstadien behandelt wurden, zeigten eine genau entgegengesetzte Reaktion, da nur nach der Behandlung im Zweiblattstadium zwittrige Blüten zu beobachten waren. Bei keiner weiteren Untersuchung bei der eine AgNO_3 Behandlung zu einem frühen Entwicklungsstadium (Zweiblattstadium oder früher) erfolgte, wurde jedoch von zwittrigen Blüten berichtet (BAYER 1976a/b, KALLOO und FRANKEN 1978, YIN und QINN 1995).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass sich die Ethylensensitivität der Pflanzen im Verlauf der Entwicklung verändert, denn nur mit einer unterschiedlichen Ethylensensitivität kann die altersabhängige Reaktion der Versuchspflanzen erklärt werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine altersabhängige Expression der Ethylenrezeptoren in den Blüten sein, wie sie bereits bei Tomaten nachgewiesen wurde (LASHBROOK et al. 1998). Eine entwicklungsabhängige Expression wurde jedoch auch für die beteiligten Gene der Ethylensynthese bei der Gurke nachgewiesen (KAMACHI et al. 1997; SHIOMI et al. 1998) (weiteres siehe Kapitel 3.1.2).

Aufgrund der in den Kapiteln 2.3.3, 2.3.4 und 2.3.5 dargestellten Ergebnisse und der bis heute von anderen Forschungsgruppen veröffentlichten Resultate ist davon auszugehen, dass die männlichkeitsfördernden Chemikalien GA, AgNO_3 und 1-MCP bei gynözischen Pflanzen unterschiedlich auf die Geschlechtsausprägung bzw. deren Faktoren wirken. Dennoch können Gemeinsamkeiten beobachtet werden. So führen Gibberellin -, 1-MCP- und AgNO_3 -Behandlungen bei einem frühen Entwicklungsstadium zum direkten Wechsel von weiblichen zu männlichen Blüten. Bei älteren Pflanzen zeigt das 1-MCP keine Reaktion, das Gibberellin wirkt unverändert mit nur männlichen Blüten und das AgNO_3 führt zur Entstehung von

männlichen und zwittrigen Blüten (BEYER 1976 a/b, BEYER 1979; KALLOO und FRANKEN 1978, YIN und QINN 1995) (Kapiteln 2.3.3, 2.3.4 und 2.3.5).

Weiterhin konnten die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Applikationsversuche weitere Beweise für eine ethylenabhängige Reaktion der geschlechtsdeterminierenden Faktoren liefern. Folglich sind diese Faktoren wahrscheinlich Elemente der Ethylenperzeption bzw. der Ethylensignaltransduktion oder haben einen direkten Einfluss auf diese.

Aufgrund der Blütenmutationsstudien von KATER et al. (2001) können weitere Schlussfolgerungen über die Funktion dieser ethylenabhängigen geschlechtsdeterminierenden Faktoren erfolgen. Wenn die C-Funktionsgene durch Überexpression deaktiviert werden, bilden sich im dritten Wirtel der weiblichen Blüten Petalen aus und im vierten Wirtel der männlichen Blüten undeterminiertes Gewebe. Damit wird die beim Wildtyp und bei den A- und B- Funktionsmutanten zu beobachtende Unterdrückung dieser Meristembereiche bei der C-Funktionsmutante aufgehoben (KATER et al. 2001).

Die Expressionsanalysen der A-, B- und C-Funktionsgene konnten keinen Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Blüten nachweisen. Außerdem wurde eine Ethylen oder Gibberellin abhängige Expression der A-, B- und C- Funktionsgene durch Applikationsbehandlungen und eine anschließende Expressionsanalyse ausgeschlossen (PERL-TREVES 1998a). Da jedoch die morphologischen Studien der C-Funktionsmutaten vermuten lassen, dass die geschlechtsdeterminierenden Faktoren einen Einfluss auf die C-Funktionsgene haben müssen (KATER et al. 2001), erfolgt dieser Einfluss wahrscheinlich direkt oder indirekt auf posttranskriptioneller Ebene.

2.4.4 Erweiterung und Kritisierung der Ein-Hormonhypothese

Die ersten Hypothesen zur Geschlechtsausprägung bei der Gurke basierten auf der Annahme, dass ein weiblichkeits- und ein männlichkeitsförderndes Hormon die Geschlechtsdetermination regulieren (CHAILAKHYAN 1979; DURAND und DURAND 1984). Bei dieser als Zwei-Hormonhypothese bezeichneten Theorie wirkt das Ethylen weiblichkeitsfördernd und das Gibberellin männlichkeitsfördernd (GALUN 1961). Da jedoch mittels dieser Zwei-Hormonhypothese das Auftreten von männlichen und weiblichen Blüten ohne die Entwicklung von zwittrigen Blüten (monözischer Geschlechtstyp) nicht erklärt werden konnte, war es notwendig, nach anderen Erklärungsansätzen zu suchen.

Die daraufhin entwickelte Ein-Hormonhypothese basiert auf der Annahme, dass lediglich das Ethylen direkt die Männlichkeit unterdrückt und die Weiblichkeit fördert. Dies geschieht durch die Aktivierung von spezifischen Ethylenrezeptoren (YIN und QUINN 1995). Bei der Ein-Hormonhypothese wird damit vorausgesetzt, dass nur das Ethylen eine direkte Wirkung auf die geschlechtsdeterminierenden Faktoren ausübt. Alle weiteren Phytohormone (siehe

Kapitel 2.1.4), die einen Einfluss auf die Geschlechtsdetermination haben, wirken indirekt auf den Geschlechtsausprägungsmechanismus.

Die Ethylenkonzentration konnte bereits vor der Entwicklung dieser Hypothese mit dem *Acr/acr* Locus korreliert werden, da dieser im dominanten Zustand zu einer erhöhten Ethylenkonzentration führt (TREBITSH et al. 1987). Folglich wurde bei der Entwicklung der Ein-Hormonhypothese die Ethylenkonzentration in Abhängigkeit zum *Acr/acr* Gen gesetzt. In weiteren Untersuchungen gelang es, die Wirkung des *Acr/acr* Gens auch molekulargenetisch zu bestätigen (TREBITSH et al. 1997; KAMACHI et al. 1997). Die Tatsache, dass das *Acr/acr* Gen für eine ACC-Synthase kodieren könnte, steht im Einklang mit der Ein-Hormonhypothese (YIN und QUINN 1995). Die Untersuchungsergebnisse zur molekularen Charakterisierung des *Acr/acr* Gens der vorliegenden Arbeit werden in Kapitel 3 vorgestellt.

Die Reaktion der Blütenbildung auf die unterschiedliche Ethylenkonzentrationen erfolgt bei der Ein-Hormonhypothese durch einen weiblichkeitsfördernden und einen männlichkeitsinhibierenden Rezeptor (siehe Kapitel 2.1.6, Abb. 2.6). Die Sensitivität des männlichkeitsinhibierenden Rezeptors wird bei der Ein-Hormonhypothese durch das Gen *M/m* gesteuert, indem das dominante Allel einen sensitiveren Zustand bedingt. Für den weiblichkeitsfördernden Rezeptor ist in dem Modell nur eine Sensitivitätsstufe vorgesehen.

Die tatsächliche Existenz der postulierten geschlechtsdeterminierenden Ethylenrezeptoren konnte bis heute nicht nachgewiesen werden. Bereits bei der Entwicklung der Ein-Hormonhypothese von YIN und QUINN (1995) wurde jedoch darauf hingewiesen, dass die geschlechtsdeterminierenden Faktoren auch den Ethylenrezeptoren nachgeschaltet sein könnten. Sowohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als auch die zur Entwicklung der Ein-Hormonhypothese verwendeten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die postulierten männlichkeitsinhibierenden und weiblichkeitsfördernden Ethylenrezeptoren auch Elemente der Ethylensignaltransduktion sein können oder diese beeinflussen (siehe auch Kapitel 4.1.2).

Das Hauptziel bei der Entwicklung der Ein-Hormonhypothese (YIN und QUINN 1995) bestand darin, den Wechsel von männlichen zu weiblichen Blüten an einer Pflanze ohne das Auftreten hermaphroditischer Blüten aufzuklären. Folglich wurde die Reaktion von monözischen (*MM acracr*) und hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Geschlechtstypen auf verschiedene physiologisch wirksame Chemikalien miteinander verglichen (YIN und QUINN 1995). Diese Geschlechtstypen unterscheiden sich jedoch in beiden für die Hypothese zu untersuchenden Majorgenen (*Acr/acr* und *M/m*), so dass nur die gemeinsame Wirkung dieser Gene untersucht wurde (YIN und QUINN 1995).

Eine weitere Einschränkung bei der Entwicklung der Ein-Hormonhypothese bestand darin, dass die Pflanzen nur in einem frühen Entwicklungsstadium (Zweiblattstadium) behandelt wurden.

Diese Auswahl des Pflanzenmaterials und des Behandlungszeitpunktes hatte zur Folge, dass nicht alle Effekte der eingesetzten Chemikalien auf die Geschlechterdetermination für die Entwicklung der Ein-Hormonhypothese berücksichtigt werden konnten. Folglich ist die postulierte zeitgleiche Hemmung der geschlechtsdeterminierenden Faktoren (Ethylenrezeptoren) nur durch die Wirkung der eingesetzten Chemikalien während eines frühen Entwicklungsstadiums der Versuchspflanzen zu bestätigen. Diese wurde durch einen direkten Wechsel von weiblichen zu männlichen Blüten bei den AgNO_3 behandelten monözischen Geschlechtstypen erklärt (Yin und Quinn 1995).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass eine AgNO_3 Applikation von gynözischen Pflanzen bei einem späten Entwicklungsstadium zu keiner gleichzeitigen Inhibierung der geschlechtsdeterminierenden Faktoren führt, da auch zwittrige Blüten induziert wurden (siehe auch Kapitel 2.4.3).

Durch die Entwicklung der Ein-Hormonhypothese ist es möglich, die monözische Geschlechtsausprägung zu erklären, bei der es zwischen männlicher und weiblicher Phase nicht zu hermaphroditischen, sondern zu geschlechtslosen Blüten kommt (siehe Ein-Hormonhypothese, Abb. 2.6). Der Nachweis dieser geschlechtslosen Blüten gelang erstmals bei den blütenmorphologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 2.10 und Abb. 2.11, Kapitel 2.3.1).

Die Ein-Hormonhypothese postuliert, dass sich die geschlechtslosen Blüten in der gemischt blühenden Phase (männliche und weibliche Blüten) der monözischen Geschlechtstypen entwickeln. Während dieser Blütenphase wurden jedoch bei den untersuchten Versuchspflanzen keine geschlechtslosen Blüten beobachtet. Statt dessen entwickelten sich die geschlechtslosen Blüten, nachdem die gynözischen und phänotypisch andrözischen (monözische Genotypen) Linien das Wachstum durch die Entwicklung eines terminalen Blütenstand beendet hatten (siehe Kapitel 2.3.1).

Über die Entwicklung dieser geschlechtslosen Blüten bei der Gurke wurde in der Literatur bis heute nicht berichtet. Da die geschlechtslosen Blüten auch bei dem untersuchten Pflanzenmaterial der vorliegenden Arbeit sehr selten zu beobachten waren, liegt die Vermutung nahe, dass es einen Mechanismus geben könnte, der diesen Blütentyp unterdrückt. Warum dieser Mechanismus bei älteren Pflanzen nicht vollständig funktionsfähig ist oder ob der determinierte Wuchs des verwendeten Pflanzenmaterials die Ausbildung von geschlechtslosen Blüten fördert, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Weiterhin erklärt die Ein-Hormonhypothese nicht, dass die hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Geschlechtstypen neben den zwittrigen Blüten auch männliche Blüten ausbilden, die isogen gynözischen (*MM AcrAcr*) Geschlechtstypen jedoch rein weiblich blühen.

Da die Ethylenkonzentration der gynözischen und hermaphroditischen Geschlechtstypen identisch ist (TREBITSH et al. 1987; YAMASAKI et al. 2001), entscheidet lediglich die Sensitivität des männlichen Rezeptors (*M/m* Gen), ob die Pflanzen weiblich oder zwittrig

blühen. Nach der Ein-Hormonhypothese müssten deshalb bei den gynözischen (*MM AcrAcr*) Linien eine Anzahl von geschlechtslosen Blüten entstehen, die identisch mit der Anzahl der männlichen Blüten bei den isogen hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Linien ist (siehe Ein-Hormonhypothese, Abb. 2.6).

Diese Förderung von männlichen Blüten durch das Produkt des *m* Allels wurde auch bei früheren Untersuchungen nachgewiesen (GALUN 1961, SHIFRISS 1961 und KUBICKI 1969e).

Aufgrund dieser Analysen vermuteten die Autoren, dass entweder eine pleiotrope Wirkung des Allels *m* auf eine verstärkte Bildung männlicher Blüten vorliegt (GALUN 1961), oder eine enge Kopplung des *m* Allels mit Genen, die die Produktion von männlichen Blüten fördern, besteht (SHIFRISS 1961; KUBICKI 1969e). Außerdem könnte auch eine pleiotrope Wirkung des dominanten *M* Allels vorliegen, die zu einer Unterdrückung der männlichen Blüten führt.

Die F_1 aus einer gynözisch x hermaphroditisch Kreuzung blüht stets rein weiblich und zeigt bei einigen Untersuchungen sogar eine Superdominanz (PIKE und MULKEY 1971). Bei einer Kopplung hätte in einigen Fällen ein Austausch von männlichkeitsfördernden Genen vom rezessiven *m* Allel zum dominanten *M* Allel stattfinden müssen (GALUN 1961; SCOTT und BAKER 1976; MULKEY und PIKE 1972). Auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten nahe isogenen gynözischen und hermaphroditischen Nachkommenschaften wurde kein Austausch von männlichkeitsfördernden Genen beobachtet. Folglich ist eine pleiotrope Wirkung des rezessiven *m* Allels (Förderung der männlichen Blüten) oder des dominanten *M* Allels (Unterdrückung der männlichen Blüten) zu vermuten.

Physiologisch könnte diese pleiotrope Wirkung des *M/m* Gens dadurch erklärt werden, dass der weiblichkeitsfördernde Faktor vom *M* Allel (männlichkeitsinhibierenden Faktor) beeinflusst wird. Diese Beeinflussung ist denkbar, wenn das Produkt des *M* Allels dem weiblichkeitsfördernden Faktor bei der bereits diskutierten Ethylensignaltransduktion vorgeschaltet ist und damit eine zusätzliche Förderung der Weiblichkeit verursacht.

Ein weiteres Indiz für eine Förderung des weiblichen Faktors durch das *M* Allel besteht darin, dass die Weiblichkeit der zwittrigen Blüten nicht immer vollständig ausgeprägt wird. So entwickeln sich in einem Nodium einer hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Linie zwittrige Blüten mit einem unterschiedlichen Grad an Weiblichkeit. Diese unterschiedliche Förderung bzw. Hemmung der Weiblichkeit ist bei den weiblichen Blüten der gynözischen Linien (*MM AcrAcr*) nicht zu beobachten (siehe Kapitel 2.3.1, Abb. 2.8) (KUBICKI 1969e). Auch diese blütenmorphologische Besonderheit kann nicht mit Hilfe der Ein-Hormonhypothese erklärt werden, da eine identische Förderung der Weiblichkeit durch den weiblichkeitsfördernden Rezeptor bei beiden Geschlechtstypen postuliert wurde (siehe Ein-Hormonhypothese, Kapitel 2.1.6, Abb. 2.6).

Aufgrund der oben diskutierten Förderung des weiblichen Faktors durch das *M* Allel könnte jedoch sowohl die vollständige Ausbildung der weiblichen Geschlechtsorgane bei den gynözischen Genotyp (*MM AcrAcr*) als auch die unvollständige Förderung der Weiblichkeit bei den zwittrigen Blüten der hermaphroditischen (*mmAcrAcr*) Linien erklärt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erstmals postulierte Förderung des weiblichen Faktors durch den männlichen Faktor (*M/m* Gen) steht jedoch im Widerspruch zu der Ausprägung von geschlechtslosen Blüten (s.o.). Außerdem ist eine Induktion von zwittrigen Blüten bei gynözischen Pflanzen nach AgNO_3 Applikation mit der Annahme der Abhängigkeit beider Faktoren nicht möglich (siehe Abb. 2.13 c, Kapitel 2.3.3). Diese Ergebnisse können nur durch eine Unabhängigkeit des weiblichkeitsfördernden Faktors vom männlichkeitsinhibierenden Faktor erklärt werden.

Jedoch wurden sowohl die sterilen Blüten als auch die Induktion von zwittrigen Blüten durch AgNO_3 bei gynözischen Geschlechtstypen nur in einem späten Entwicklungsstadium der Versuchspflanzen beobachtet (s.o. und Abb. 2.16, Kapitel 2.3.4). Folglich könnte vermutet werden, dass die Unabhängigkeit des weiblichkeitsfördernden Faktors von dem männlichkeitsinhibierenden Faktor erst während des Alterungsprozesses der Pflanze erreicht wird.

Bereits bei der Tomate (LASHBROOK et al. 1998) und bei *Arabidopsis* (HUA et al. 1998) wurde eine solche unterschiedliche Reaktionen auf Ethylen im Verlauf der Entwicklung der Pflanzen nachgewiesen. So gelang es, eine spezifische Expression der für Ethylenrezeptoren kodierenden Gene in verschiedenen Geweben in bestimmten Entwicklungsstadien nachzuweisen (LASHBROOK et al. 1998).

Auch bei der Gurke wurde die Expression der drei bekannten Ethylenrezeptoren (*CsETR1*, *CsETR2*, *CsERS*) innerhalb der Sprossspitze bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht. Da jedoch kein spezifisches Gewebe für diese Untersuchung verwendet wurde, konnten zwischen den Entwicklungsstadien der Versuchspflanzen keine eindeutigen Unterschiede nachgewiesen werden (YAMASAKI et al. 2000) (näheres siehe Kapitel 4.1.2.1: Die Ethylenrezeptoren und ihre Wirkungsweise).

Bei der Entwicklung der Ein-Hormonhypothese wurden lediglich die physiologische Wirkung der Majorgene *Acr/acr* und *M/m* berücksichtigt. Neben diesen Genen hat jedoch auch das *A/a* Gen einen entscheidenden Einfluss bei der Geschlechtsausprägung. Das *A/a* Gen führt im rezessiven Zustand zur Entstehung von andrözischen Pflanzen, ist gegenüber dem dominanten *Acr/acr* Gen hypostatisch und wirkt folglich nur bei *acr/acr* Genotypen (Kubicki 1969b). Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften könnte das *A/a* Gen zwei Faktoren bei der Ein-Hormonhypothese beeinflussen.

Zum einen besteht die Möglichkeit, dass das *A/a* Gen einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Ethylensynthese hat und z. B. für ein Enzym der Ethylensynthese kodiert (siehe Kapitel 3.1.2).

Die zweite Möglichkeit bestehen darin, dass das *A/a* Gen einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Ethylenaktivität hat. Als direkte Wirkung auf die Ethylenaktivität könnte eine Beeinflussung der Sensitivität des weiblichkeitsfördernden Faktors zum Ethylen durch das *A* Allel vermutet werden. Eine indirekte Wirkung auf die Ethylenaktivität könnte zum Beispiel

durch eine Erhöhung der Gibberellinkonzentration durch das *a* Allel erfolgen, da Gibberellin bei der Gurke antagonistisch zur Ethylenaktivität wirkt (Kapitel 2.1.4). In beiden Fällen (direkte oder indirekte Wirkung) würde das dominante *A* Allel zu einer erhöhten Ethylensensitivität der Pflanzen führen und damit auch bei niedrigen Ethylenkonzentrationen die Ausprägung von weiblichen Blüten bzw. weiblichen Blütenorganen bedingen (siehe Ein-Hormonhypothese, Kapitel 2.1.6, Abb. 2.6, S. 19). Bis heute wurden keine Untersuchungen zur molekularen Wirkungsweise des *A/a* Gens durchgeführt.

Aufgrund der besonderen physiologischen Wirkungsweise des *Tr/tr* Gens ist auch eine Integration dieses Gens in die Ein-Hormonhypothese möglich. Das *Tr/tr* Gen führt im dominanten Zustand zur Ausprägung eines trimonözischen Geschlechtstyps mit männlichen, weiblichen und zwittrigen Blüten (KUBICKI 1969f). Die entstehenden zwittrigen Blüten besitzen jedoch einen anderen morphologischen Habitus (hypogyn zwittrig) als die zwittrigen Blüten der hermaphroditischen Geschlechtstypen (epigyn zwittrig) (siehe Abb. 2.9 in Kapitel 2.2.1). Daraus schließt der Autor, dass das Allel *Tr* die Unterdrückung der Weiblichkeit in den männlichen Blüten aufhebt (KUBICKI 1969f). Mit dieser Annahme von KUBICKI (1969f) könnte die Wirkungsweise des *Tr/tr* Gens mit der in der Ein-Hormonhypothese definierten Funktion des weiblichkeitsfördernden Faktors identisch sein oder diesen beeinflussen.

Ein weiteres Indiz für diese Vermutung ist die Induktion von perigyn weiblichen Blüten nach einer Ethephonbehandlung von gynözischen Linien (siehe Abb. 2.9 in Kapitel 2.2.1). Weiterhin entsteht dieser Blütentyp bei gynözischen Pflanzen mit einem dominanten *Tr* Allel (KUBICKI 1969f). Ob das Produkt des *Tr/tr* Gens und der weiblichkeitsfördernde Faktor identisch sind, muss jedoch durch zukünftige Untersuchungen geklärt werden.

Die Gurke entwickelte sich der Theorie nach, wie alle anderen getrenntgeschlechtlich blühenden Pflanzenarten, im Laufe ihrer phylogenetischen Entwicklung aus einer zwittrigen Ursprungsform (KUBICKI 1969f; BAWA 1980; CHARLSWORTH und CHARLSWORTH 1987;). Diese Vermutung wird durch die Ausbildung von Anlagen weiblicher und männlicher Geschlechtsorgane im frühen Entwicklungsstadium der Blütenknospen (KUBICKI 1969f) und durch die Untersuchungen von KATER et al. (2001) bestätigt (siehe Kapitel 2.11 und 2.1.2). Folglich werden grundsätzlich männliche und weibliche Geschlechtsorgane ausgebildet, wenn keine geschlechtsregulativen Gene (z.B. männlicher Faktor, *M/m* Gen) die Ausbildung von fertilen Blütenorganen unterbrechen (KATER et al. 2001). Nach der Ein-Hormonhypothese erfolgt, wenn kein geschlechtsdeterminierender Faktor (Ethylenrezeptor) aktiviert wird, jedoch eine männliche anstatt der theoretisch erwarteten zwittrigen Geschlechtsausprägung (siehe Ein-Hormonhypothese, Kapitel 2.1.6, Abb. 2.6).

Diese männliche Grunddetermination ist durch zwei verschiedene Mechanismen zu erklären. Zum einen könnte ein bis heute unbekannter Faktor die C-Funktionsgene im vierten Wirtel hemmen und damit zur Unterdrückung der weiblichen Geschlechtsausprägung führen (siehe Kapitel 2.1.2). Dieser Faktor müsste unabhängig vom Ethylen sein, so dass männliche Blüten

entstehen, wenn die drei Majorgene (*Acr/acr*, *M/m* und *A/a*) rezessiv vorliegen. Die Inaktivierung dieses Faktors und damit die Wiederherstellung der Wirkung der C-Funktionsgene, die zur Ausbildung der Karpetalen führen, erfolgt dann durch den weiblichkeitsfördernden Faktor (weiblicher Ethylenrezeptor bei der Ein-Hormonhypothese, Kapitel 2.1.6, Abb. 2.6).

Der zweite Erklärungsansatz besteht darin, dass der weibliche Faktor ohne Ethylen die C-Funktionsgene im vierten Wirtel hemmt und damit zur Unterdrückung der weiblichen Geschlechtsausprägung führt. Folglich würde erst das Ethylen diese Hemmung der Weiblichkeit revidieren. Eine solche negative Regulation durch Ethylen wurde bei *Arabidopsis* für einige physiologische Mechanismen nachgewiesen (HUA und MEYEROWITZ 1998).

Nach der Ein-Hormonhypothese können alle Gene, die in die Ethylensynthese eingreifen oder die Ethylenperzeption bzw. Ethylensignaltransduktion verändern, einen Einfluss auf die Geschlechtsausprägung haben. Diese Beeinflussung kann direkt oder indirekt erfolgen.

Obwohl mit Hilfe der Ein-Hormonhypothese nicht alle Beobachtungen erklärt werden können, ist sie eine wertvolle Grundlage für die Entwicklung von neuen Hypothesen zur physiologischen Wirkungsweise der geschlechtsdeterminierenden Gene. So können durch die Erweiterung und Modifizierung der Ein-Hormonhypothese neue Strategien zur Isolierung der geschlechtsdeterminierenden Gene entwickelt werden.

3 Genetische und molekulare Charakterisierung des *Acr/acr* Gens

3.1 Einleitung

3.1.1 Klassisch genetische Analysen des *Acr/acr* Gens

Der Grad der Weiblichkeit der ursprünglich monözischen Gurke wurde erstmals durch TKACHENKO (1935) klassisch genetisch charakterisiert und mit dem Gen *F/f* für *femaleness* beschrieben. Zum Beginn der 60er Jahre erfolgte eine erneute Charakterisierung dieses Gens durch SHIFRISS (1961). Die bei diesen Untersuchungen eingeführte Bezeichnung *Acr/acr* für *Acceleration* (Überspringen der männlichen Blütenphase) wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

KUBICKI (1969b) konnte für den *Acr* Locus eine multiple Allelie nachweisen und beschreibt fünf verschiedene Allele, die einen unterschiedlichen Grad der Weiblichkeit bedingen. Die Vollständigkeit der Dominanz von *Acr* über *acr* ist abhängig von den vorliegenden Allelen, vom genetischen Hintergrund und von Umweltbedingungen (SHIFRISS 1961; SHIFRISS und GEORGE 1964; GALUN 1961 und 1974; KUBICKI 1969b).

Die Intensivierung oder Abschwächung der Weiblichkeit durch den genetischen Hintergrund konnte aufgrund von Spaltungsanalysen beobachtet werden (SHIFRISS 1961; GALUN 1961; SHIFRISS et al. 1964 und SHIFRISS und GEORGE 1964). Diese vom genetischen Hintergrund abhängige Weiblichkeit konnte jedoch nur KUBICKI (1969c) durch ein weiteres unabhängig vererbtes Gen *In-F* für *intensifier femaleness* genetisch charakterisiert werden. Das Gen *In-F* führt in Kombination mit den unterschiedlichen Allelen des *Acr/acr* Locus im dominanten Zustand zu einer Steigerung der Anzahl weiblicher Blüten. Insbesondere bei den Allelen des *Acr* Locus, die zu einem geringen Grad der Weiblichkeit führen, zeigt das dominante Allel des *InF*-Locus einen weiblichkeitsfördernden Einfluss (KUBICKI 1969c). Aber auch KUBICKI (1969a,b,c,d) geht von weiteren geschlechtsmodifizierenden Minorgenen in seinen Nachkommenschaften aus.

Bei allen Untersuchungen zeigte sich, dass mit Hilfe des *Acr/acr* Gens der größte Anteil des Grades der Weiblichkeit erklärt werden kann. Aufgrund von QTL-Analysen verschiedener Nachkommenschaften wurde ein prozentualer Anteil des *Acr/acr* Gens bei der Ausprägung der Weiblichkeit von ca. 67 bis 74% nachgewiesen (SERQUEN et al. 1997). Neben den im genetischen Hintergrund wirkenden Minorgenen können auch bestimmte Umweltbedingungen die genetisch determinierte weibliche Geschlechtsausprägung von Pflanzen beeinflussen (weiteres siehe Kapitel 2.1.5) (FRANKEL und GALUN 1977; CANTLIFFE 1981; LOWER und EDWARDS 1986; VICE-PRUCE 1975; MALEPSZY und NIERMIROWICZ-SZCZYTT 1991).

Ein weiteres Gen, dessen Wirkung nur im Zusammenhang mit dem rezessiv *acr* Allel zu einem andrözischen Geschlechtstyp führt, wurde als *A/a* Gen für *andrözisch* beschrieben (KUBICKI 1969d). Die damit bestehende Hypostasie des *A/a* Gens gegenüber dem dominanten

Acr Gen steht jedoch in Abhängigkeit zu den oben beschriebenen beeinflussenden Faktoren und ist folglich nicht immer vollständig (KUBICKI 1969d).

Da in diesem Kapitel das *Acr/acr* Gen molekulargenetisch analysiert werden soll, besteht die Notwendigkeit, das verwendete Pflanzenmaterial bezüglich des *Acr/acr* Locus zu charakterisieren. Aufgrund der beschriebenen Komplexität bei der Ausprägung der Weiblichkeit werden daher zunächst mit Hilfe von Kreuzungsanalysen die weiblichkeitsfördernden genetischen Faktoren bei dem verwendeten Pflanzenmaterial charakterisiert. Ein Teil der durchgeführten Kreuzungen wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von Herrn SCHMOLKE durchgeführt.

3.1.2 Die Ethylenbiosynthese und die molekulargenetische Funktion des *Acr/acr* Gens bei der Ethylensynthese

Untersuchungen über die Geschlechtsausprägung der Gurke deuten darauf hin, dass das Gen *Acr/acr* eine Schlüsselfunktion bei der Ethylensynthese hat und somit die Ethylenkonzentration in der Pflanze beeinflusst (ATSMON und TABBAK 1979; TREBITSH et al. 1987; TREBITSH et al. 1997; KAMACHI et al. 1997). In den letzten Jahrzehnten wurde die Biochemie und die molekulare Regulation der Ethylensynthese bei der Tomate, Kürbis, Tabak, Arabidopsis, Reis und Kartoffel weitgehend aufgeklärt (ADAMS und YANG 1979; YANG 1980; SATO und THEOLOGIS 1989, zusammengefasst in KENDE 1993).

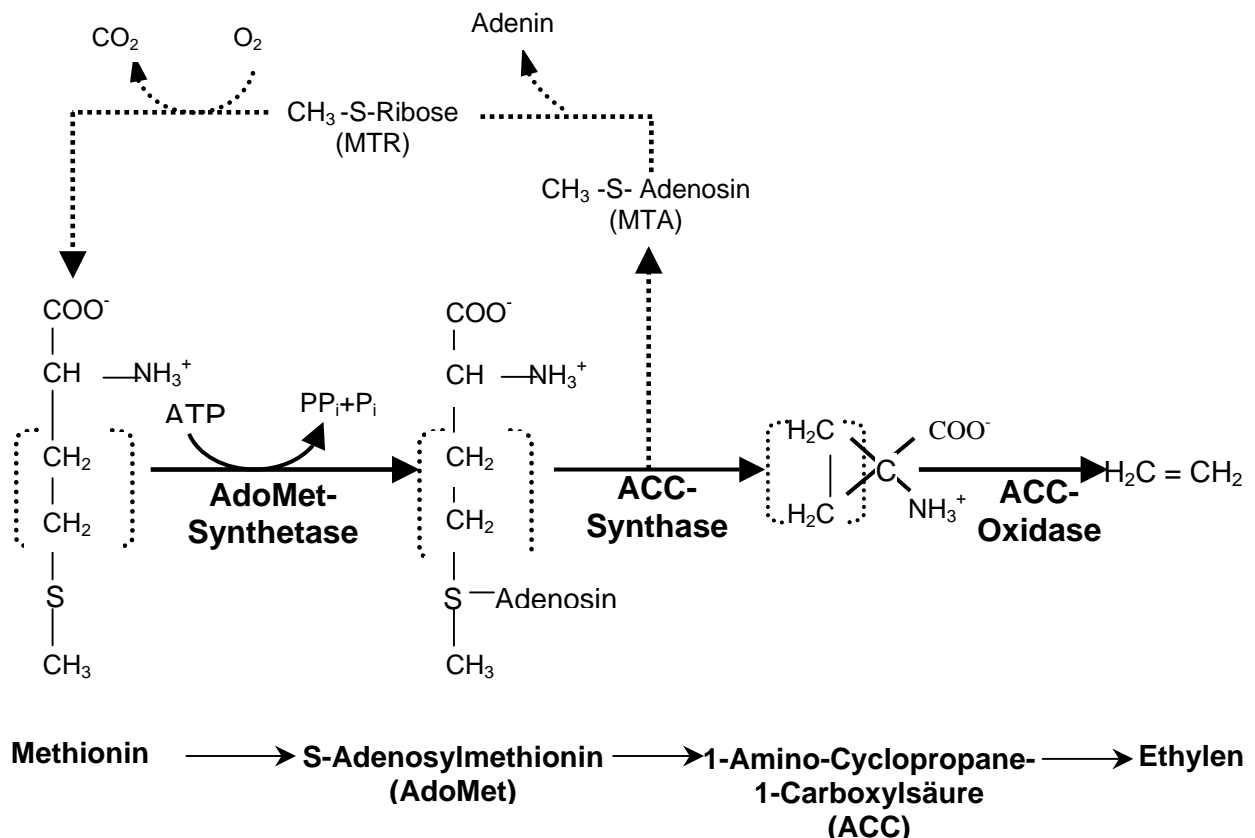


Abb. 3.1: Schema der Ethylenbiosynthese in höheren Pflanzen (THEOLOGIS und ZAREMBINSKY 1993, verändert) MTA = Methylthioadenosin; MTR = Methylthioribose.

Ausgangsverbindung bei der Ethylensynthese ist das Methionin (siehe Abb. 3.1). An der Umsetzung dieses Methionins über S-adenosyl-Methionin (AdoMet) und 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylsäure (ACC) zu Ethylen sind drei verschiedene Enzyme beteiligt: die S-Adenosyl-Methionin-Synthetase (AdoMet-Synthetase), die 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylsäure-Synthase (ACC-Synthase) und die 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylsäure-Oxidase (ACC-Oxidase) (siehe Abb. 3.1).

Während die AdoMet-Synthetase und die ACC-Oxidase meist in einer ausreichend hohen Konzentration vorliegen, fungieren die ACC-Synthase als regulatives Schlüsselenzym bei der Ethylensynthese (ABELES et al. 1992). Aufgrund dieser Schlüsselrolle der ACC Synthase bei der Ethylensynthese sind in den letzten Jahren eine Anzahl von Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Struktur und Wirkungsweise dieses Enzyms durchgeführt worden (ABEL et al. 1995; MATHOOKO et al. 1997; zusammengefasst in DOLAN 1997; ALEXANDER und GRIERSON 2002).

Bis heute wurden bei vielen Pflanzenarten für ACC-Synthasen kodierende Gene kloniert: u. a. bei *Cucurbita pepo* (HUANG et al. 1991); *Cucurbita maxima*, (NAKAGAWA et al. 1991); *Lycopersicon esculentum* (OLSON et al. 1991; ROTTMANN et al. 1991); *Arabidopsis thaliana* (LIANG et al. 1992); *Oryza sativa* (ZAREMBINSKY and THEOLOGIS 1993); *Solanum tuberosum* (DESTEFANO-BELTRAN et al. 1995).

Aufgrund dieser Ergebnisse zeigte sich, dass alle klonierten ACC-Synthasesequenzen Mitglieder einer Multigenfamilie sind (zusammengefasst in DOLAN 1997; ALEXANDER und GRIESON 2002).

Für eine Regulierung der Aktivität von ACC-Synthasen, die sich je nach Gewebe, Entwicklungsstadium und externen Faktoren unterscheidet, sind multiple Gene notwendig. Die Existenz einer multigenen Familie von mehreren verschiedenen ACC-Synthasen bei einer Pflanzenart und die Tatsache das mehrere Loci für eine identische ACC-Synthase kodieren können, wurde von vielen Arbeitsgruppen bestätigt (HUANG et al. 1991; OLSON et al. 1991; ROTTMAN et al. 1991; LIANG et al. 1992; KENDE 1993; ZAREMBINSKI und THEOLOGIS 1993; BARRY et al. 1996; FLUHR und MATTOO 1996; TREBITSH et al. 1997; KAMACHI et al. 1997; SHIOMI et al. 1998; MATHOOKO et al. 1999; KAHANA et al. 1999) (zusammengefasst in ALEXANDER und GRIERSON 2002).

Die Rate der Ethylenproduktion ist in den meisten Gewebebereichen gering, sie kann aber in bestimmten Entwicklungsstadien erhöht werden, wie z.B. während der Keimung und Fruchtreife (YANG und HOFFMAN 1984; ABELES et al. 1992; FLUHR und MATTOO 1996). Eine erhöhte Ethylensynthese kann auch durch verschiedene externe Stimuli induziert werden, z.B. durch Stressfaktoren wie Verwundungen, Temperaturschwankungen (NAKAGAWA et al. 1991, SHIOMI et al. 1998; MATHOOKO et al. 1999), hohe CO₂-Konzentrationen (MATHOOKO et al. 1999) und elektrischen Strom (INABA et al. 1991) oder durch Auxin-Behandlungen (NAKAGAWA et al. 1991; TREBITSH et al. 1997; KAMACHI et al. 1997; SHIOMI et al. 1998; MATHOOKO et al. 1998). Die Stimulation der Ethylenbiosynthese durch verschiedene Reize

geschieht durch die Induktion der ACC-Synthase- und ACC-Oxidase-Aktivität und der nachfolgenden Akkumulation der Transkripte ihrer Gene (KENDE 1993; TREBITSH et al. 1997; KAMACHI et al. 1997; SHIOMI et al. 1998; MATHOOKO et al. 1999; KAHANA et al. 1999). Die ACC-Synthaseaktivität und die ACC Oxidaseaktivität kann jedoch auch durch den gezielten Einsatz bestimmter Chemikalien gehemmt werden (z.B. Hemmung der ACC-Synthase durch AVG; Aminoetoxyvinylglycine) (ATSMON und TABBAK 1979; OWENS et al. 1980) (weiteres siehe Kapitel 2.1.6).

Bei der Gurke wurden bis heute vier unterschiedliche ACC-Synthasen nachgewiesen (TREBITSH et al. 1997; KAMACHI et al. 1997). Die entsprechenden mRNA-Sequenzen und zum Teil auch die genomischen DNA-Sequenzen dieser vier ACC-Synthase-Gene konnten bereits kloniert und charakterisiert werden (TREBITSH et al. 1997; KAMACHI et al. 1997; SHIOMI et al. 1998). In Tab. 3.1 sind alle veröffentlichten ACC-Synthase-Gene der Gurke mit den entsprechenden Genbankakzessionsnummern dargestellt. Da die Autoren zum Teil unterschiedliche Gennamen für identische ACC-Synthasen verwendet haben wurden in Tab. 3.1 die homologen Gene unter einem gemeinsamen Gennamen (verwendeter Gennamen) zusammengefasst (siehe Tab 3.1, erste Spalte). Diese in der Tab. 3.1 angegebenen Bezeichnungen der *CsACC*-Synthasen werden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Tab. 3.1 : Veröffentlichte *CsACC*-Synthase-Gene mit den entsprechenden Genbankakzession der NCBI Genbank.

verwendete Gennamen ^y	Art der Sequenz	Gennamen der Autoren	Genbankakzession	Autoren
CsACS1	genom. partiell	<i>CsACS1</i>	U59813	TREBITSH et al. (1997)
	mRNA	<i>CsACS3</i>	AB003683 ^x	KAMACHI et al. (1997)
	mRNA	<i>CsACS3</i>	AB006805	SHIOMI et al. (1998)
CsACS2	mRNA	<i>CsACS2</i>	D89732 ^x	KAMACHI et al. (1997)
CsACS3	genomisch	<i>CsACS2</i>	AB032938	SHIOMI et al. (1998)
	mRNA	<i>CsACS2</i>	AB006804	SHIOMI et al. (1998)
CsACS4	mRNA	<i>CsACS4</i>	AB003684 ^x	KAMACHI et al. (1997)
	genomisch	<i>CsACS1</i>	AB032937	SHIOMI et al. (1998)
	mRNA	<i>CsACS1</i>	AB006803	SHIOMI et al. (1998)

^x : Genbankakzession konnte nicht in der von den Autoren angegebenen NCBI Datenbank gefunden werden

^y : Die unter den verwendeten Gennamen (z.B. *CsACS1*) zusammengefassten Sequenzen weisen eine 100% Homologie untereinander auf

Die erste ACC-Synthasesequenz (*CsACS1*) wurde von TREBITSH et al. (1997) isoliert und bezüglich der Geschlechtsausprägung bei der Gurke untersucht. Durch den Einsatz von nahe isogenen monözischen und gynözischen Gurkenlinien bei Southern-Hybridisierungen zeigte sich bei den Restriktionsenzym/Sonden Kombinationen von *MspI/acs1* und *XbaI/acs1* neben identischen Hybridisierungssignalen ein zusätzliches Signal bei den gynözischen Pflanzen. TREBITSH et al. (1997) vermuteten, dass im Genom der gynözischen Linien eine zusätzliche Kopie der *CsACS1*-Sequenz vorliegen muss. Diese bis heute unbekannt Sequenz

bezeichneten die Autoren als *Cs-ACSIG*. In der getesteten F₂-Populationen konnte keine Rekombination zwischen *CsACSIG* und dem *Acr/acr*-Locus festgestellt werden, so dass TREBITSH et al. (1997) von einer 100%igen Kopplung zwischen der *CsACSIG* Sequenz und dem *Acr/acr*-Locus ausgehen.

Expressionsanalysen des *CsACSI* Gens zeigten, dass die Expressionsintensität durch Auxin sowohl bei den gynözischen als auch bei den monözischen Linien in der Sprossspitze erhöht wird (TREBITSH et al. 1997).

Auch KAMACHI et al. (1997) gelang die Klonierung von drei für ACC-Synthasen kodierenden cDNA's, von denen eine mit der von (TREBITSH et al. 1997) isolierten *CsACSI* eine Homologie von 100% aufweist (siehe Tab. 3.1). Während für das Gen *CsACS4* kein Expressionsunterschied zwischen den gynözischen und monözischen Linien nachgewiesen wurde, gelang es KAMACHI et al. (1997), eine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Entwicklung von weiblichen Blütenknospen und der Transkriptionsintensität des Gens *CsACS2* in den Sprossspitzen gynözischer und monözischer Linien nachzuweisen. Die Expression von *CsACS2* ist daher nach KAMACHI et al. (1997) für die Induktion weiblicher Blüten bei gynözischen und monözischen Linien verantwortlich.

Vergleichende Expressionsstudien der Gene *CsACSI* (TREBITSH et al. 1997) und *CsACS2* (KAMACHI et al. 1997) zeigten, dass bei den isogen gynözischen Linien sowohl das Gen *CsACSI* als auch das Gen *CsACS2* transkribiert wird. Bei den monözischen Linien zeigte sich jedoch nur eine Transkription des Gens *CsACS2* (KAMACHI et al. 2000). Außerdem konnte die bereits bei nicht isogenen monözischen und gynözischen Linien nachgewiesene stärkere Expression des Gens *CsACS2* bei gynözischen Linien bestätigt werden (KAMACHI et al. 2000).

Eine mögliche Regulierung der Ethylenproduktion durch Transkriptionsregulation von ACC-Synthase-Genen bei der Gurke wird auch durch die Untersuchungen von SHIOMI et al. (1998) und MATHOOKO et al. (1999) bestätigt. Die Autoren klonierten und sequenzierten drei der bereits bekannten cDNA-Sequenzen der ACC-Synthasen (*CS-ACSI CS-ACS3 CS-ACS4*) (siehe auch Tab. 3.1) aus Früchten (SHIOMI et al. 1998). Die Expressionsanalysen dieser Gene mittels Northern-Hybridisierungen ergaben, dass Verwundungen eine Akkumulation der mRNA von *CS-ACSI* und *CS-ACS3* induzieren, während eine Auxin-Behandlung die Expression von allen drei ACC-Synthase-Genen (*CS-ACSI CS-ACS3 CS-ACS4*) induziert (SHIOMI et al. 1998). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Expression der ACC-Synthase-Gene unterschiedlich reguliert wird und dass die Akkumulation ihrer Transkripte zu einer erhöhten Ethylenproduktion führt (TREBITSH et al. 1997; KAMACHI et al. 1997; SHIOMI et al. 1998; MATHOOKO et al. 1999; MIZUSAWA und MATSUURA 1999).

Neben der ACC-Synthase hat auch das letzte Enzym der Ethylensynthese, die ACC-Oxidase (siehe Abb. 3.1) einen Einfluss auf die Ethylenkonzentration der Pflanzen. Daher könnten auch die für ACC-Oxidasen kodierenden Gene mit dem *Acr/acr* Gen bzw. mit der

Ausprägung der Weiblichkeit korreliert werden. Folglich wurden drei verschiedene ACC-Oxidase-Gene (*CS-ACO1*, *CS-ACO2* und *CS-ACO3*) (siehe Tab. 3.2) isoliert und im Zusammenhang mit der Geschlechtsausprägung bei der Gurke untersucht (PERL-TREVES et al. 1998b).

Tab. 3.2 : Veröffentlichte *CsACO*-Gene mit den entsprechenden Genbankakzession der NCBI Genbank und den Autoren.

verwendete Genname ^x	Art der Sequenz	Genname der Autoren	Genbank-akzession	Autoren
CsACO1	mRNA	<i>CsACO1</i>	AF33581	PERL-TREVES et al. (1998b)
	mRNA	<i>CsACO2</i>	AB006807	SHIOMI et al. (1998)
CsACO2	mRNA partiell	<i>CsACO2</i>	AF33582	PERL-TREVES et al. (1998b)
CsACO3	mRNA	<i>CsACO3</i>	AF033583	PERL-TREVES et al. (1998b)
	mRNA	<i>CsACO1</i>	AB006806	SHIOMI et al. (1998)

^x : Die unter den Gennamen (z.B. *CsACS1*) zusammengefassten Sequenzen weisen eine 100% Homologie untereinander auf

Kopplungsstudien mittels Southern-Hybridisierungen ergaben, dass zwischen dem Gen *CsACO2* und dem *Acr/acr*-Locus ein Abstand von 8,7 cM besteht (KAHANA et al. 1999).

Die durchgeführten Expressionsanalysen der ACC-Oxidasen zeigten eine negative Korrelation zwischen der Expression der Gene *CsACO2* und *CsACO3* in der Sprossspitze und der weiblichen Geschlechtsausprägung bei den gynözischen und monözischen Linien. Dagegen wurde in jungen Blättern eine positive Korrelation zwischen dem Niveau der *CsACO2*- bzw. *CsACO3*-Transkripten und dem Grad der Weiblichkeit festgestellt (KAHANA et al. 1999).

Unterschiede bei der Expression der beiden Gene *CsACO2* und *CsACO3* nach Ethephonbehandlungen deuten darauf hin, dass es in den Sprossspitzen als Folge einer negativen Rückkopplung zu einer Blockierung der Expression von *CsACO3* durch Ethylen kommt. In den Blättern dagegen wird die Transkription der Gene *CsACO2* und *CsACO3* durch eine positive Rückkopplung reguliert (KAHANA et al. 1999).

Aufgrund der Unbeständigkeit des gasförmigen Ethylens ist eine lokale Produktion dieses Hormons notwendig (Tomate; BARRY et al. 1996). Folglich wird im gewebespezifischen Wirkungsort des Ethylens die Expression der ACC-Oxidasen reguliert (FLUHR und MATTOO 1996; TANG et al. 1993). Dagegen wird das von der ACC-Synthase produzierte ACC in der ganzen Pflanze transportiert, so dass dieses Enzym nicht am Wirkungsort des Ethylens exprimiert werden muss (WOLTERING 1990; ELESE et al. 1993).

Aufgrund von Pfropfungsversuchen zwischen Linien mit unterschiedlicher Konstitution des *Acr/acr* Locus ist ein Transport von ACC über das Xylem auch bei der Gurke zu vermuten (wie in Kapitel 2.3.2 dargestellt und bereits auch bei FRIEDLANDER et al. (1977b) beschrieben).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass die Expression von *CS-ACO2* und *CS-ACO3* in der Sprossspitze nicht der limitierende Faktor für die Ausbildung von weiblichen

Blüten ist (KAHANA et al. 1999). Folglich ist ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Weiblichkeit bzw. dem *Acr/acr* Gen und einem ACC-Oxidase-Gen auszuschließen, so dass keine weiteren Analysen der ACC-Oxidasen bei der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst durch den Einsatz des von TREBITSH et al. (1997) entwickelten RFLP-Markers eine Charakterisierung des *Acr/acr* Gens beim verwendeten Pflanzenmaterial. Ein Teil dieser Arbeiten wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von Herrn SCHMOLKE durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.1.2).

Zur Analyse unbekannter ACC-Synthasen bei der Gurke wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst degenerierte Primer eingesetzt. Die unbekannt isolierten ACC-Synthase-Gene sollen anschließend in Verbindung mit der Geschlechtsausprägung untersucht werden. Dazu wurde die Expression der neu detektierten ACC-Synthase-Gene in unterschiedlichen Organen (z. B. Blätter und Wurzeln) mittels RT-PCR analysiert.

Weitere Untersuchungen bestanden darin, den von KAMACHI et al. (1997) detektierten Expressionsunterschied des *CsACS2* Gens bei gynözischen und monözischen Linien auf der Ebene der genomischen DNA zu detektieren. Dazu werden die Ergebnisse von Southern-Hybridisierungen mit *CsACS2* spezifischen Sonden vorgestellt.

Außerdem erfolgt in der vorliegenden Arbeit eine molekulargenetische Analyse der bis heute unbekannt mit dem *Acr/acr* Gen gekoppelten *CsACSIG* Sequenz (TREBITSH et al. 1997), durch Southern-Hybridisierungen mit *CsACSI*-Gen spezifischen Sonden bei gynözischen (*MM AcrAcr*) und phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Pflanzen. Die Auswertung der polymorphen Hybridisierungsmuster bei verschiedenen Restriktionsenzym/Sonden-Kombinationen soll anschließend zur Erstellung einer Restriktionskarte der *CsACSI* und *CsACSIG* Sequenz genutzt werden. Diese Restriktionskarte wird im Folgenden dazu verwendet werden, homologe und heterologe Bereiche der beiden Sequenzen zu ermitteln und mit Hilfe dieser die Sequenz *CsACSIG* zu isolieren.

Alle neuen Informationen der bekannten und unbekannt ACC-Synthasen sollten dazu genutzt werden, das *Acr/acr* Gen zu isolieren und molekulargenetisch zu charakterisieren.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Pflanzenmaterial

Die verwendeten gynözischen, monözischen und andrözischen isogenen Linien stammen aus einem Rückkreuzungsprogramm, das für die hermaphroditischen Linien bereits in Abb. 2.7 im Kapitel 2.2.1.1 dargestellt wurde. In Abb. 3.2 ist ein Ausschnitt aus dem Rückkreuzungsprogramm der monözischen Linien dargestellt.

Für die Erstellung der F_1 wurden die in Kapitel 2.2.1.1 beschriebenen gynözischen ($MMAcrAcr$) Pflanzen (siehe Abb. 2.7) mit monözischen Pflanzen ($MMacracr$) gekreuzt. Die F_1 Nachkommenschaft mit heterozygoten *Acr/acr*-Locus kann aufgrund der unvollständigen Dominanz des *Acr/acr* Gens neben den weiblichen Blüten auch einige männliche Blüten entwickeln, so dass ein subgynözischer Phänotyp entsteht. Nach der Selbstung dieser F_1 Nachkommenschaft kommt es zur Aufspaltung am *Acr/acr*-Locus, so dass in der F_2 Nachkommenschaft gynözische ($MMAcrAcr$), subgynözische ($MMAcracr$) und monözische ($MMacracrA$) Pflanzen auftreten.

Durch Aufspaltung am *A*-Locus können außerdem neben den monözischen ($MMacracrA$) Geschlechtstypen auch andrözische ($MMacracr aa$) Geschlechtstypen auftreten.

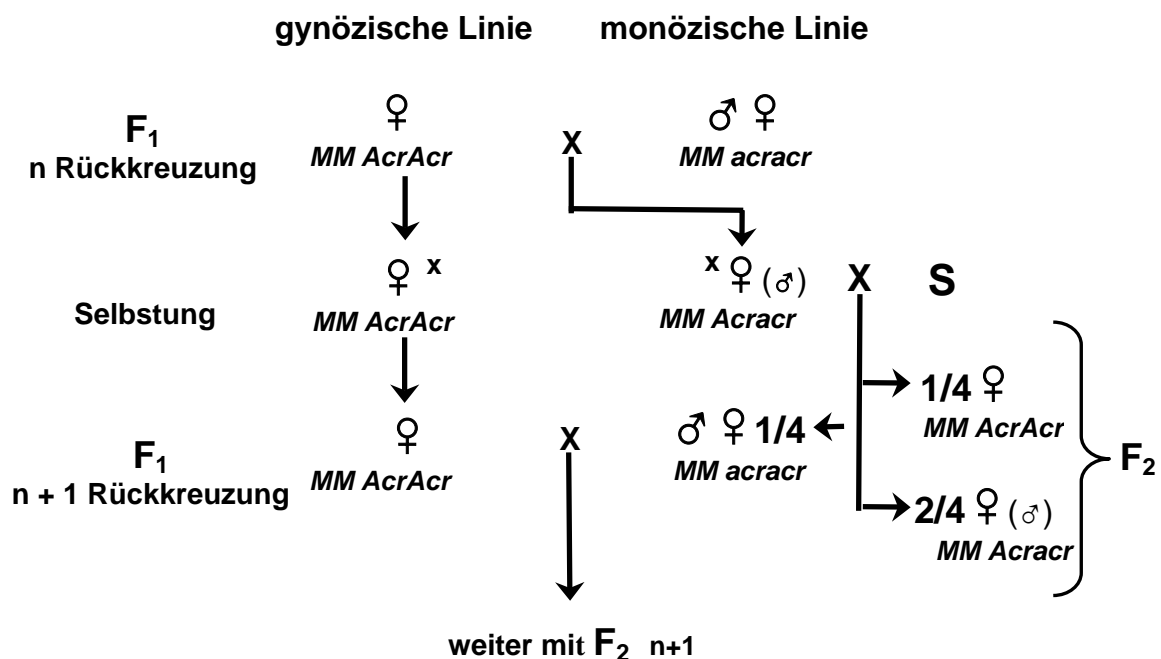


Abb. 3.2 : Rückkreuzungsprogramm zur Herstellung gynözischer und monözischer Linien der genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD, ♀(♂) = subgynözischer Phänotyp, ♂ ♀ = können aufgrund des determinierten Wachses auch einen subandrözische Phänotyp zeigen S = Selbstung; x = $AgNO_3$ Behandlung zur Induktion männlicher Blüten.

Aufgrund des determinierten Wachses (näheres siehe Pflanzenmaterial; Kapitel 2.2.1.1 und Diskussion; Kapitel 2.4.1) des verwendeten Pflanzenmaterial treten jedoch auch *acracr MM A.* Genotypen auf, die einen phänotypisch andrözischen Geschlechtstyp aufweisen (FRANKEN 1979), so dass keine eindeutige Aufspaltung am *A*-Locus beobachtet werden kann.

Aufgrund der in Kapitel 3.1.1 bereits erläuterten Umwelteinflüsse auf die Ausprägung des *Acr/acr*-Locus kann auch eine phänotypische Unterscheidung zwischen den monözischen (*acracr MM A.*) und subgynözischen (*MM Acracr ..*) Pflanzen problematisch sein (FRANKEN 1979; GÖNEN 1975). Folglich ist auch bei dem verwendeten Pflanzenmaterial eine Differenzierung zwischen den verschiedenen gemischt blühenden Geschlechtstypen in den Nachkommenschaften nur teilweise möglich. Dennoch konnten bei den vorangegangenen Arbeiten in den genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD nach mindestens 6 Rückkreuzungen Linien mit einem Isogenitätsgrad von über 99% erreicht werden.

Außerdem ist eine phänotypische Unterscheidung zwischen den monözischen (*acracr MM A.*) und subgynözischen (*Acracr MM*) Pflanzen notwendig.

Um die monözischen von den subgynözischen Geschlechtstypen bei dem verwendeten Pflanzenmaterial unterscheiden und charakterisieren zu können und zur Klärung der Dominanz des *Acr/acr* Locus, erfolgten Kreuzungsanalysen.

Als Ausgangsmaterial wurden aus dem laufenden Rückkreuzungsprogramm (Abb. 3.2) eine gynözische-, eine F₁-, eine F₂- und eine monözische bzw. subgynözischen Selbstungs-Nachkommenschaft aus jedem genetischen Hintergrund (WrD, ED und ECD) entnommen (Abb. 3.2). Insgesamt wurden für jede Nachkommenschaft 30 bis 60 Pflanzen kultiviert (Aussaat und Kulturbedingungen siehe Kapitel 2.2.1.2).

Zur besseren Unterscheidung der bei den Testkreuzungen (Kapitel 3.2.2) eingesetzten gynözischen Pflanzen wurden die aus dem Rückkreuzungsprogramm stammenden gynözischen Linien als definiert (def.) gynözisch bezeichnet (Abb. 3.2).

3.2.2 Kreuzungsanalysen zur genaueren Charakterisierung des *Acr/acr*-Locus in dem verwendeten Pflanzenmaterial

Aufgrund der bereits erläuterten Einflüsse bei der Ausprägung des *Acr/acr*-Locus ist eine phänotypische Unterscheidung zwischen den monözischen (*acracr MM A.*) und subgynözischen (*Acracr MM ..*) Pflanzen bei dem verwendeten Pflanzenmaterial nicht möglich.

Um diese monözischen bzw. subgynözischen Phänotypen dennoch genotypisch unterscheiden zu können, wurden innerhalb der genetischen Hintergründe WrD und ED (siehe Kapitel 3.3.1) verschiedene Testkreuzungen zwischen den Pflanzen des Ausgangsmaterials (siehe Abb. 3.2) durchgeführt (Abb. 3.3 bis Abb. 3.5).

Um aufzuklären, ob die in der F₁ Nachkommenschaft auftretenden monözischen bzw. subgynözischen und gynözischen Linien (siehe Kapitel 3.3.1.1, Tab. 3.7) durch eine Aufspaltung am *Acr* Locus oder durch Umwelteffekte entstehen, wurden diese Phänotypen der F₁ mit definiert gynözischen Linien gekreuzt (siehe Abb. 3.3, Kreuzung A und B).

def. gynözische Linien		selektiert aus F ₁ (♂ ♀ x ♀)	→ mögliche Genotypen der selektierten Pflanzen
MM <i>AcrAcr</i> ..			
♀ gynözisch	A X	♂ ♀ / ♀ (♂) monözisch / subgynözisch	→ <i>MM Acracr</i> .. ♀ (♂)
♀ gynözisch ^y	B X	♀ gynözisch	→ <i>MM Acracr</i> .. ♀ <i>MM AcrAcr</i> .. ♀

Abb. 3.3 : Testkreuzungen A und B innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes zwischen den Pflanzen des Ausgangsmaterials (Abb. 3.2).

^y : bei diesen Pflanzen wurden männliche Blüten durch AgNO₃ induziert

Zur Analyse der F₂ Nachkommenschaften erfolgte eine Rückkreuzung mit def. gynözischen Linien und gynözischen, subgynözischen, monözischen und andrözischen Geschlechtstypen der F₂ Nachkommenschaft (siehe Abb. 3.4 Kreuzung C, D und E).

def. gynözische Linien		selektiert aus F ₂ (♂ ♀ x ♀)	→ mögliche Genotypen der selektierten Pflanzen
MM <i>AcrAcr</i> ..			
♀ gynözisch ^y	C X	♀ gynözisch	→ <i>MM Acracr</i> .. ♀ <i>MM AcrAcr</i> .. ♀
♀ gynözisch	D X	♂ andrözisch	→ <i>MM <i>acracr</i> aa</i> ♂ <i>MM <i>acracr</i> A.</i> ♂ ^b
♀ gynözisch	E X	♂ ♀ / ♀ (♂) monözisch / subgynözisch	→ <i>MM <i>acracr</i> A.</i> ♂ ♀ <i>MM Acr <i>acr</i> ..</i> ♂ ♀ ^a

Abb. 3.4: Testkreuzungen C, D und E innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes zwischen den Pflanzen des Ausgangsmaterials (Tab. 3.3).

^a: Durch unvollständige Dominanz des *Acr/acr* Gens ist auch dieser Genotyp möglich

^b: Durch den determinierten Wuchs ist auch dieser Genotyp möglich

^y : bei diesen Pflanzen wurden männliche Blüten durch AgNO₃ induziert

Zur Kontrolle der Selbstungsnachkommenschaft der monözischen bzw. subgynözischen Pflanzen, in denen andrözische, monözische und gynözische Pflanzen auftraten, erfolgten Testkreuzungen der andrözischen und monözischen Phänotypen mit def. gynözischen Linien (siehe Abb. 3.5, Kreuzung F und G).

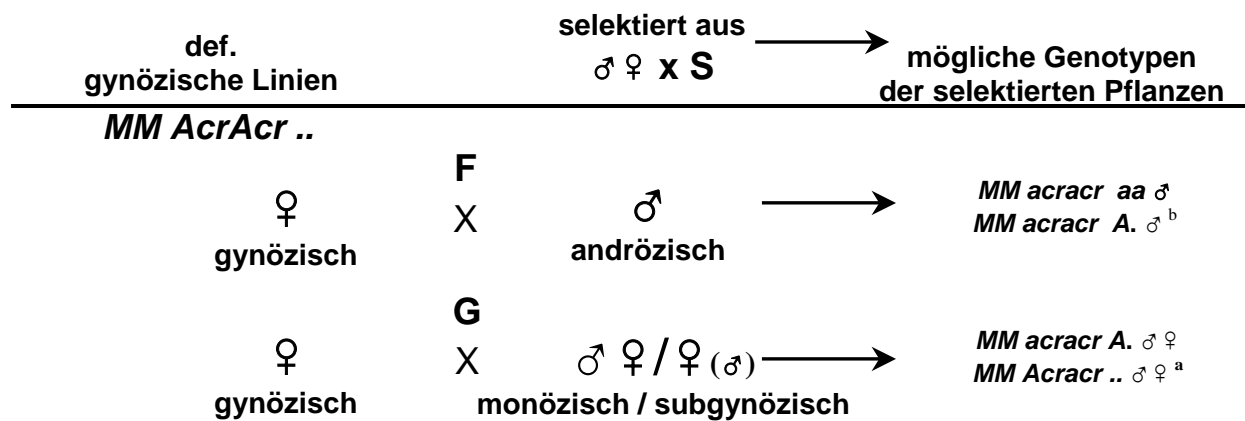


Abb. 3.5: Testkreuzungen F und G innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes zwischen Pflanzen des Ausgangsmaterials.

^a: Durch unvollständige Dominanz des *Acr/acr* Gens ist auch dieser Genotyp möglich

^b: Durch den determinierten Wuchs ist auch dieser Genotyp möglich

Jede der in den Abb. 3.3 bis Abb. 3.5 dargestellten Kreuzungen erfolgte sechsmal mit verschiedenen Pflanzen. Um eine Fremdbestäubung zu verhindern, wurde ein bis zwei Tage vor der Kreuzung die noch nicht geöffnete weibliche Blüte der Mutterpflanze mit einer Klammer verschlossen. Für die Kreuzung wurden von der Vaterpflanze drei bis vier voll entwickelte männliche Blüten verwendet, bei denen zur besseren Handhabung die Petalen entfernt wurden. Die Durchführung der Kreuzungen erfolgte durch das direkte Aufbringen des Pollens auf den Fruchtknoten der weiblichen Blüte mit der männlichen Blüte.

Nach der Ernte der Früchte erfolgte anschließend die Aussaat des produzierten Saatgutes. Die Anzucht und die Bonitur der Kreuzungsnachkommen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben.

3.2.3 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Nachkommenschaften wird mittels Durchführung eines χ^2 Test überprüft. Der χ^2 Wert wird bei 2 Klassen mit folgender Formel berechnet:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^2 \frac{(B_i - E_i)^2}{E_i}$$

B_i = Beobachtungswert der i-ten Klasse
 E_i = Erwartungswert der i-ten Klasse

Die Zahl der Freiheitsgrade ist bei N-Klassen = N-1. Die χ^2 -Werte 3,84 (bei zwei Klassen) bzw. 5,991 (bei drei Klassen) führen zu einer signifikanten Ablehnung einer Hypothese (erwartete Spaltungsverhältnisse) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$. Die Irrtumswahrscheinlichkeit gibt die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art an, d.h. in 5% der betrachteten Stichproben wird das erwartete Verhältnis abgelehnt, obwohl die Grundgesamtheit dem erwarteten Verhältnis entspricht.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ werden beobachtete Aufspaltungen, deren χ^2 -Wert gleich oder grösser als 3,84 bzw. 5,99 ist als signifikant verschieden von einem

erwarteten Spaltungsverhältnis gewertet. Die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Stichprobe als nicht spaltend interpretiert wird, ist von der Stichprobengröße und dem tatsächlichen Spaltungsverhältnis abhängig. Die Wahrscheinlichkeit ergibt sich aus dem Binom $(a + b)^n$, wobei a und b die relativen Häufigkeiten und n die Stichprobengröße darstellt. Wird dies auf ein 1:3-Verhältnis bezogen, folgt $(0,25 + 0,75)^n$, entsprechend gilt für ein 1:1-Spaltungsverhältnis $(0,5 + 0,5)^n$. Soll die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% betragen, so muss die Stichprobengröße entsprechend gross gewählt werden. Zur Ablehnung eines 1:1-Spaltungsverhältnisses ist dazu eine minimale Stichprobengröße von 5 Pflanzen notwendig, zur Ablehnung eines 1:3-Spaltungsverhältnisses müssen die Daten von mindestens 11 Pflanzen vorliegen. Um ein Spaltungsverhältnis von 1:1 und 3:1 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ sicher unterscheiden zu können, wird die notwendige Stichprobengröße folgendermassen berechnet (ESCH; pers. Mitteilung):

Der χ^2 -Wert kann bei 2 Klassen durch folgende Formeln berechnet werden:

Für ein 1:1 Verhältnis gilt: $\chi^2 = (a - b)^2 / n$, mit $a : b = 1:1$.

Für ein 3:1 Verhältnis gilt: $\chi^2 = (a - 3b)^2 / 3n$, mit $a : b = 3:1$.

Zur Bestimmung der notwendigen Stichprobengröße (n) um ein 1:1 von einem 3:1 Verhältnis unterscheiden zu können, erfolgt eine Gleichsetzung dieser Formeln und die Auflösung nach n :

$$1) \quad \chi^2 = \frac{(a - b)^2}{n} = \frac{(a - 3b)^2}{3n}$$

$$2) \quad n = \chi^2_{\text{Tab}} \left(\frac{1 + \sqrt{3}}{1 - \sqrt{3}} \right)^2 = 53,5$$

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ folgt bei 2 Klassen ein χ^2 -Wert von 3,84. Für die Abgrenzung der Spaltungsverhältnisse 1:1 und 3:1 muss eine Stichprobenzahl grösser als n bonitiert werden. Damit ist eine sichere Unterscheidung einer 1:1 von einer 3:1 Aufspaltung nur mit einer Stichprobengröße von mindestens 54 Pflanzen möglich.

3.2.4 Isolierung von DNA

Die DNA-Isolierung erfolgte mit der "Serum separation tube technique" (BENTZEN et al. 1990, verändert), einer Extraktionsmethode, die der CTAB-Methode von SAGHAI-MAROOF et al. (1984) sehr ähnlich ist. Durch den Einsatz der "Serum separation tubes" (SST = Röhrchen mit integriertem Serumentrenner; Fa. Becton-Dickinson) konnte jedoch mit kleineren Volumina gearbeitet werden. Das Pflanzenmaterial wurde in einer Schwingmühle (Fa. Retsch) gemörsert. Die dafür genutzten Geräte wurden zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt. Das gemörserte Pflanzenmaterial kann anschliessend bis zur Isolierung bei -80°C gelagert werden. Zum Aufschluss der Zellen wurden etwa 250mg gemörsertes Pflanzenmaterial mit 1,5ml 1,3x CTAB in ein SST gegeben und für 90min im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Nun folgte eine Extraktion mit 1,5ml Phenol für 10min (auf einem Schüttler) und 15min Zentrifugation bei

5000xg (4°C). Der Serumtrenner lagerte sich dabei zwischen die Phasen. Der Überstand wurde in ein neues SST übertragen und es erfolgte die Zugabe von 1,5ml eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (25:24:1) in dieses Röhrchen. Anschliessend wurde erneut 10min geschüttelt und wie oben zentrifugiert. Das Chloroform sollte die Denaturierung der Proteine und die Phasentrennung erleichtern, der Isoamylalkohol verhinderte das Schäumen und das Ausbilden einer intensiven Interphase. Anschliessend wurde mit 0,15 units RNase (Fa. Gibco BRL) für 20min bei 37°C ein RNA-Verdau durchgeführt. Nun folgte eine einmalige Chloroform-Extraktion (analog der Phenol-Extraktion). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 1,5ml Isopropanol und 150µl 3M Na-Acetat zugegeben, und die DNA für mindestens 20min bei -20°C präzipitiert. Es folgte eine 15min Zentrifugation bei 15000xg (4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 100ml 70%igem Ethanol gelöst, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäss überspült und erneut für 15min bei 15000xg (4°C) zentrifugiert. Anschliessend erfolgte die Trocknung im Heizblock bei 60°C und die Lösung des Pellets in einer entsprechenden Menge sterilem bi-dest. Wasser. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch über die Extinktion bei 260nm bestimmt. Nach SAMBROOK et al. (1989) entsprechend einer optischen Dichte von 1 (OD 1) 50µg doppel-strängige DNA pro ml. Es konnten zwischen 80 und 350µg DNA pro Probe extrahiert werden.

Verwendete Chemikalien:

- 1,33% (w/v) CTAB:
 - 67mM Tris/HCl;
 - 13,4mM EDTA; pH 8,0
 - 0,93M NaCl;
 - 1% (w/v) PVP-40.
 - 1,33% (w/v) CTAB
- RNase (Fa. Gibco BRL)
- Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol
- Isopropanol, 3M Na-Acetat, 70%iges (v/v) Ethanol

3.2.5 Isolierung der RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus jungen Blütenknospen, aus Blättern und aus Wurzeln der gynözischen und andrözischen Linien des genetischen Hintergrundes WrD mit Hilfe des RNA Kits (Fa. Machery und Nagel). Bei diesem Kit werden mittels einer integrierten DNaseI Inkubation verbliebene DNA Kontaminationen entfernt, so dass eine DNase Restriktion und anschließende Aufreinigung entfällt. Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte über die Extinktionsmessung bei 260nm (SAMBROOK et al. 1989) oder wurde mit einer Verdünnungsreihe von λ-DNA auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,1µl Ethidiumbromid pro ml-Gellösung mittels einem Transilluminator (UV-Licht, 302nm) geschätzt.

Verwendete Chemikalien:

- RNA Kit (Fa. Machery und Nagel)
- Ethidiumbromid
- 100bp-Leiter (Fa. Pharmacia)
- Agarose
- Orange G-Ladepuffer (30% Glycerin, 0,25% Orange G)
- 1xTAE (pH 8)
 - 40mM Tris-acetat
 - 1mM EDTA
- Verdünnungsreihe von λ-DNA; 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250ng

3.2.6 Amplifikation und Isolierung verschiedener *CsACC*-Synthase-Gene

Die Konstruktion der spezifischen Primer Paare wurde mittels Sequenzinformationen der bekannten *CsACC*-Synthase-Gene (NCBI Datenbank) und der neu isolierten unbekanntenen *CsACC*-Synthase-Gene und mit Hilfe des Programms Primer Premier (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA) durchgeführt. Um eine genügende Stringenz der Primer zu erreichen, wurden folgende grundlegende Kriterien festgelegt:

Die Primer sollten eine Länge von $22\text{bp} \pm 4\text{bp}$ und einen GC Gehalt von ca. 50% aufweisen. Weiterhin sollte der durch das Programm errechnete T_m - Wert für den Schmelzpunkt zwischen 50 und 60°C liegen. Ausserdem dürfen die Primer keine Sekundärstrukturen bilden und sollten zueinander keine komplementären Sequenzen aufweisen, um Anlagerungen, die zu einem Ausfall der Primer führen würden, zu vermeiden. Diese Komplementarität sollte insbesondere am 3' Ende vermieden werden.

Die als spezifische Primer eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert und werden in den Tabellen der jeweiligen Kapitel mit den entsprechenden annealing Temperaturen angegeben. Zur Bestimmung der annealing Temperatur wurde eine PCR mit einem Temperaturgradienten mit 8 Stufen von 45-65°C (PCR Gerät: TGradient Block der Fa. Biometra) durchgeführt.

Verwendete Chemikalien (PCR):

- Puffer: 10 mM Tris-HCl; pH 8,8; 50 mM KCl 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂ (Fa. Finnzymes über Fa. Biometra)
- 150 µM von jedem dNTP (Fa. Eurogenetech über Fa. Biozyme)
- 1 unit Taq-Polymerase DyNAzyme™ II DNA Polymerase (2 Units/µl; Fa. Finnzymes über Fa. Biometra)
- 0,25 µM sense-Primer (Fa. MWG)
- 0,25 µM antisense-Primer (Fa. MWG)

PCR Bedingungen:

- 5 Min bei 94°C
- für 45 Zyklen:
- 30 Sek. bei 94°C (Denaturierung)
- 1 Min. von 44°C bis 65°C je nach Primerpaar
- 1 Min bei 72°C (Polymerisation)
- 1,5 Zyklus bei 72°C für 20 min

Die PCR-Produkte wurden unter Zugabe von 2µl OrangeG -Ladepuffer in einem 2% Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei 5V/cm Gellänge aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid zur Gellösung (0,5µl/ml) wurde die DNA unter einem Transilluminator (UV-Licht, 302nm) sichtbar. Als Molekulargewichtsmarker diente eine 100bp-Leiter (Fa. Gibco BRL). Die entsprechenden Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und konnten bei 4°C gelagert werden. Für eine weitere Nutzung erfolgte das Einbetten in 1% Low melting Agarose und eine anschließende Überführung der DNA in 1x TAE-Puffer bei 3V/cm Gellänge in das Low melting Agarosegel. Nach dem erneuten Ausschneiden des entsprechenden DNA-Fragmentes wurde das Gewicht des Agarosegelstückes (Low

Meltingagarose) ermittelt. Anschliessend erfolgte die Zugabe eines 25x Gelase Puffers (Fa. Roche) bevor das Gelstück bei 70°C für 3min aufgeschmolzen wurde. Nach Abkühlung auf 45°C erfolgte die Zugabe von Agarase (Agarase menge und Puffer laut Herstellerangabe: Fa. Roche). Der Abbau der Agarose erfolgte für 1h im Wasserbad bei 45°C.

Die so amplifizierten und aufgereinigten DNA-Fragmente wurden dann einkloniert und sequenziert (siehe Kapitel 3.2.6.6) oder direkt als Sonde bei den Southernhybridisierungen (siehe Kapitel 3.2.7) eingesetzt.

Verwendete Chemikalien:

- Ethidiumbromid
- 100bp-Leiter (Fa. Pharmacia)
- Orange G-Ladepuffer (30% Glycerin, 0,25% Orange G)
- 1xTAE wie in 3.2.5
- Gelase (0,2 U/µl) mit Puffer (Fa. Epicentre Technologie)
- Verdünnungsreihe von λ-DNA (Fa. Gibco) 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250ng

3.2.6.1 Amplifikation unbekannter ACC-Synthase-Gene durch den Einsatz degenerierter Primern

Neben den Genen *CsACS1* und *CsACS2* können jedoch auch weitere ACC-Synthasen einen Einfluss auf die Geschlechtsausprägung der Gurke haben bzw. mit dem *Acr*-Locus gekoppelt sein. Folglich wurden degenerierte Primerpaare aus konservativen Bereichen der bekannten ACC-Synthasen der Gurke (siehe Tab. 3.3 und Abb. 3.6) abgeleitet und zur Amplifikation von unbekanntem ACC-Synthasen eingesetzt.

Zur Detektion der konservativen Sequenzbereiche erfolgte zunächst ein Homologievergleich zwischen den Aminosäuresequenzen der Gene (*CsACS1*, *CsACS2*, *CsACS3* und *CsACS4*) mit dem Programm ClustalW vom EMBL-EBI (siehe Abb. 3.6). Die konservativen Bereiche, aus denen die in Tab. 3.3 dargestellten degenerierten Primerpaare (Programm Primer Premier) abgeleitet wurden, sind grau hinterlegt und mit den entsprechenden Primernamen beschriftet (siehe Abb. 3.6)

Tab. 3.3 :Darstellung der konstruierten degenerierten Primer nach dem Homologievergleich der Gene *CsACS1*, *CsACS2*, *CsACS3* und *CsACS4* siehe Abb. 3.5.

Name	sense Primer	Name	anitsense Primer
ACSd1s	5' AT(ACT)CA(AG)AGTGGI(CT)TIGCIGA(AG)A`3	ACSd1as	5`GTICCIA(AG)IGG(AG)TTIGAIGG(AG)TT`3
ACSd2s	5`TT(CT)CA(AG)GA(CT)TA(CT)CA(CT)GGI(CT)TICC`3	ACSd2as	5`TIGC(AG)AA(AG)CAIACIC(GT)(AG)AACCA`3
ACSd3s	5`GGI(AG)TIATICA(AT)ATGGG`3		

() = variable Nukleotide an einer Position

I = Inosin (bindet an alle Nukleotide)

Sequenzinformationen der Gene *CsACS1* (U59831), *CsACS3* (AB032938) und *CsACS4* (AB32937) (NCBI Datenbank) konnten die aufgrund vorhandener Introns zu erwartenden unterschiedlichen Längen der amplifizierten Fragmente berechnet werden. In Tab. 3.4 sind die Kombinationsmöglichkeiten der degenerierten sense und antisense Primer aus der Tab. 3.3 mit den erwarteten Größen und den entsprechenden annealing Temperaturen dargestellt.

Tab. 3.4: Darstellung der Kombinationsmöglichkeiten der degenerierten Primer (siehe Tab. 3.6) und den erwarteten genomischen Größen bzw. den annealing Temperaturen.

sense Primer	antisense Primer	annealing Temp.	Genname	Größen ^x
ACSd1s	ACSd1as	45°C	<i>CsACS1</i>	728 bp
			<i>CsACS3</i>	918 bp
			<i>CsACS4</i>	1469 bp
	ACSd2as	46°C	<i>CsACS1</i>	1342 bp
			<i>CsACS3</i>	1621 bp
			<i>CsACS4</i>	2570 bp
ACSd2s	ACSd1as	46°C	<i>CsACS1</i>	493 bp
			<i>CsACS3</i>	707 bp
			<i>CsACS4</i>	1255 bp
	ACSd2as	47°C	<i>CsACS1</i>	1107 bp
			<i>CsACS3</i>	1410 bp
			<i>CsACS4</i>	2356 bp
ACSd3s	ACSd1as	46°C	<i>CsACS1</i>	734 bp
			<i>CsACS3</i>	924 bp
			<i>CsACS4</i>	1475 bp
	ACSd2as	45°C	<i>CsACS1</i>	1348 bp
			<i>CsACS3</i>	1621 bp
			<i>CsACS4</i>	2576 bp

^x: Die zu erwartende Größe wurde mit Hilfe genomischer Sequenzen der jeweiligen Gene aus der NCBI Datenbank berechnet (Akzessionsnummern und Gennamen siehe Tab. 3.1); da für das Gen *CsACS2* keine genomische Sequenz veröffentlicht wurde, konnte für dieses Gen keine erwarteten Größen angegeben werden.

Die isolierten unbekannteren ACC-Synthase ähnlichen Sequenzen wurden anschließend mittels Southern-Hybridisierungen (Methode siehe Kapitel 3.2.7) auf ihre Kopplung mit dem *Acr/acr* Gen untersucht. Bei diesen Southern-Hybridisierungen wurden die Restriktionsenzyme (*MboI*, *MvaI*, *XbaI*, *Hin6I* und *MspI*) für die Restriktion der genomischen DNA aus gynözischen (*MM AcrAcr*), subgynözischen (*MM Acracr*) und phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Pflanzen verwendet. Außerdem erfolgte nach der Konstruktion spezifischer Primer die Analyse der Expression dieser neuen Sequenzen in Blüten, Blättern und Wurzeln mittels RT-PCR (weiteres siehe Kapitel 3.2.6.5).

3.2.6.2 Amplifikation des bekannten Gens *CsACC-Synthase2*

KAMACHI et al. (1997 und 2000) konnten zwischen gynözischen (*MM AcrAcr*) und monözischen (*MM acracr*) Linien für das Gen *CsACS2* einen Expressionsunterschied nachweisen (Kapitel 3.1.2). Da dieser Expressionsunterschied durch das *Acr/acr* Gen bedingt

sein könnte, werden mittels *CsACS2* Gen homologer Sonden (siehe Kapitel 3.1.2) Kopplungsstudien zwischen gynözischen, subgynözischen und phänotypisch andrözischen Linien durchgeführt (Southern-Hybridisierungen siehe Kapitel 3.2.7). Bei auftretenden Polymorphismen zwischen den untersuchten Genotypen könnten die von KAMACHI et al. (1997 und 2000) beschriebenen Expressionsanalysen auf den *Acr* Locus zurückgeführt werden.

Da die mRNA des *CsACS2* Gens jedoch nicht mit Hilfe der von KAMACHI et al. (1997) angegebenen Genbankakzessionsnummer in der NCBI-Datenbank gefunden werden konnte, wurde zur Konstruktion eines spezifischen Primerpaars die Sequenz aus der Veröffentlichung von KAMACHI et al. (1997) verwendet. In Tab. 3.5 sind sense- und antisense-Primer für die *CsACS2* Sequenz mit der annealing Temperatur und der zu erwartenden Grösse dargestellt. Bei den Southern-Hybridisierungen wurden die Restriktionsenzyme (*MboI*, *MvaI*, *XbaI*, *Hin6I* und *MspI*) für die genomischen DNA aus gynözischen (*MMAcraCr*), subgynözischen (*MM AcraCr*) und phänotypisch andrözischen (*MM acraCr*) Pflanzen verwendet.

Tab. 3. 5: Darstellung des Primerpaars zur Amplifikation eines *CsACS2* spezifischen Fragmentes.

Primer Name	sense Primer antisense Primer	annealing Temp.	Größe
ACS2	5' TAACTGCTGGTGCCACTGCTGC'3 5' GCGAGCGGTGGTGACGACTTTA'3	59°C	533bp

3.2.6.3 Amplifikation des bekannten Gens *CsACC-Synthase1*

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse von TREBITSH et al. (1997) und von KAMATISHI et al. (2000) ist davon auszugehen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem *Acr* Locus und dem Gen *CsACSI* besteht (siehe Kapitel 3.1.2). Folglich wurde bei der vorliegenden Arbeit die Sequenz des Gens *CsACSI* bei monözischen (*acraCr MM*) und gynözischen (*AcraCr MM*) Linien genauer analysiert. Da keine vollständige genomische Sequenz dieses Gens in der Datenbank veröffentlicht wurde, erfolgte eine Konstruktion der Sequenz des Gens *CsACSI* mit Hilfe der mRNA Sequenz (Genbankakzessionsnummer AB006807 der NCBI Datenbank) und der partiellen genomischen Sequenz (Genbankakzessionsnummer AF33581 der NCBI Datenbank) (siehe auch Tab. 3.2). In Abb. 3.7 ist die *CsACSI* Sequenz mit zwei Introns (Intron I und Intron II) und mit den Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen (*MboI*, *MspI*, *MvaI* und *Hin6I*) dargestellt.

Um verschiedene Bereiche der *CsACSI* Synthase zu amplifizieren, erfolgte die Konstruktion spezifischer Primerpaare, die in Tab. 3.6 mit den entsprechenden annealing Temperaturen und den erwarteten Größen der Amplifikationsprodukte angegeben sind. Die entsprechenden Bindungssequenzen der in Tab. 3.6 angegebenen Primer sind in der Sequenz des *CsACSI* Gens in Abb. 3.7 gekennzeichnet.

Die verschiedenen Fragmente der *CsACSI* wurden sowohl aus genomischer DNA als auch aus cDNA (RT-PCR siehe Kapitel 3.2.6.5) amplifiziert, inkloniert und sequenziert (siehe Kapitel 3.2.6.6). Außerdem wurden die jeweiligen Fragmente radioaktiv markiert und als Sonden bei Southern-Hybridisierungen (Methode siehe Kapitel 3.2.7) eingesetzt.

Das mit dem Primerpaar ACS1.2 amplifizierte DNA-Fragment wurde inkloniert und zur Kontrolle sequenziert (Methoden siehe Kapitel 3.2.6.6).

Das mit dem Primerpaar ACS1.1 (Tab. 3.6) amplifizierte Fragment wurde als Sonde *acs1.1* zur Charakterisierung des Ausgangsmaterials durch Verwendung des von TREBITSH et al. (1997) entwickelten dominant/rezessiven RFLP-Markers (Enzym/Sonden Kombination = *MspI/acs1.1*) eingesetzt. Außerdem erfolgte eine Restriktion mit *MspI* und eine anschließende Auftrennung der Restriktionsprodukte in einem Agarosegel. Die damit erhaltenen Teilsequenzen der *CsACSI* wurden aus dem Agarosegel eluiert und als Sonden *acs1.1.1* (5'-Ende 579bp) und *acs1.1.2* (3'-Ende 238bp) bei Southern-Hybridisierungen zur Erstellung einer Restriktionskarte des *CsACSI* Gens bzw. der *CsACSIG*-Sequenz verwendet.

Die mit den Primerpaaren ACS1.3 und ACS1.4 amplifizierten DNA-Fragmente des *CsACSI* Gens wurden als Sonden, *acs1.3* und *acs1.4* bei der Detektion neuer kodominanter RFLP-Marker und bei Hybridisierungsanslysen zur Erstellung der Restriktionskarte des 5' Endes des Gens *CsACSI* bzw. der *CsACSIG* Sequenz (siehe Kapitel 3.1.2) verwendet. Dabei wurden die Restriktionsenzyme *MboI*, *MvaI*, *XbaI*, *Hin6I*, *MspI*, *EcoRV*, *HindIII*, *TaqI*, *Bcn I*, *Hae III*, *HinfI*, und *Rsa I* (Schnittstellen einiger Restriktiosnzyme innerhalb des *CsACSI* Gens, siehe Abb. 3.7) für die Restriktion der genomischen DNA aus gynözischen (*MM AcrAcr*), subgynözischen (*MM Acracr*) und phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Pflanzen verwendet.

Tab. 3.6 : Darstellung der verschiedenen Primerpaare zur Amplifikation unterschiedlicher Bereiche des Gens *CsACSI*. Zur Konstruktion der Primer verwendete Sequenz siehe Abb. 3.5.

Primer Name	sense Primer anitsense Primer	annealing. Temp.	Größe
ACS1.1	5`CACGGTCAAGATTCCTCCTAC`3 5`TTGTGGTTCCCAATGGGTTAG`3	52°C	817bp
ACS1.2	5`AGATGCTTTCCACAAAAGCCA`3 5`TCATAATGGAGCTTGCGGTTG`3	54°C	1666bp
ACS1.3	5`CACAAAAGCCACGTGCAATT`3 5`CGGTAAGCCGTGTAATCT`3	58°C	366bp
ACS1.4	5`CGCTCTTCCAAGATTACCA`3 5`CGGTTCTCCATTTCAAATCTC`3	57°C	352bp

Transkriptionsstart

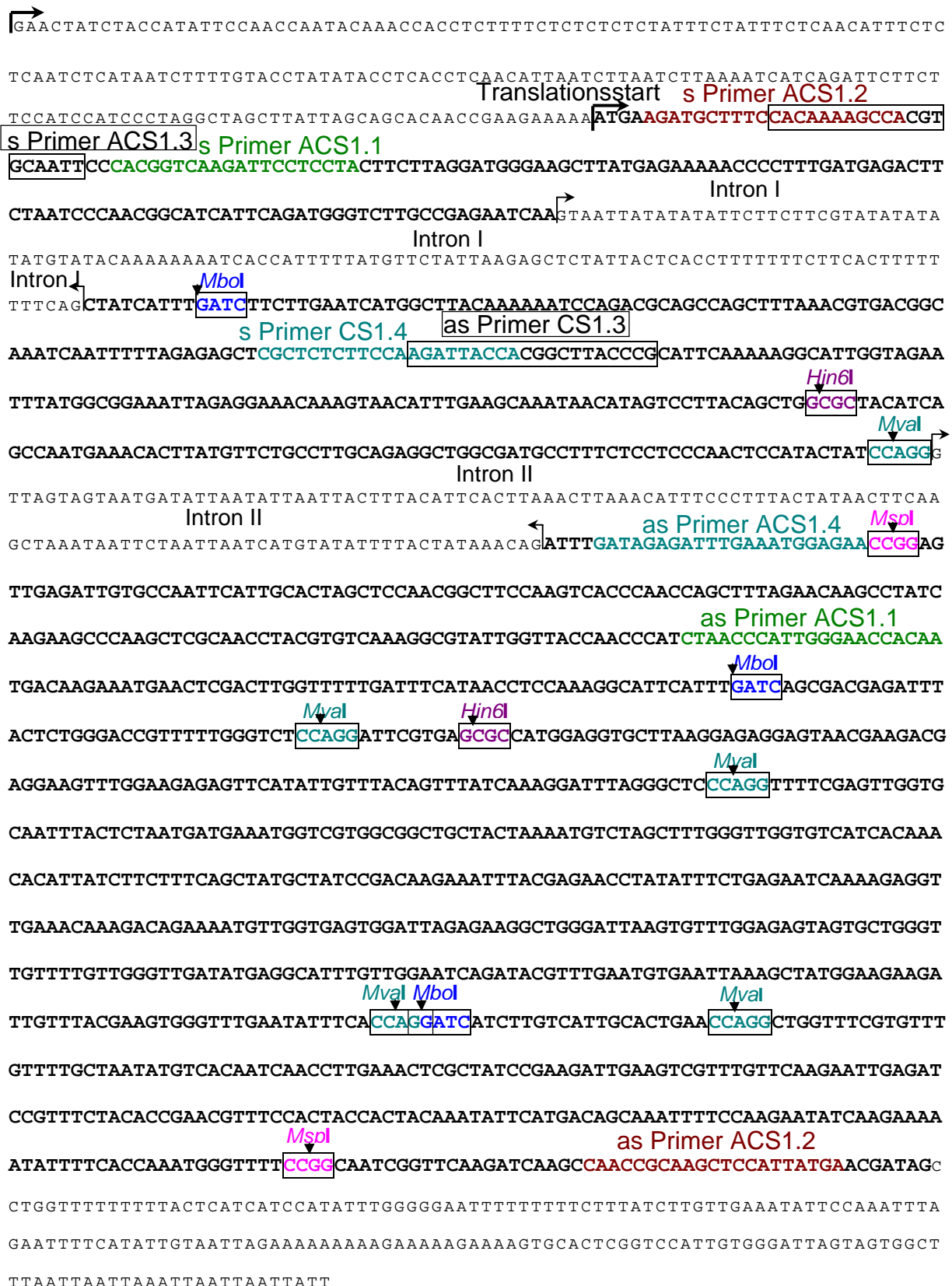


Abb. 3.7: Darstellung der mRNA (AB006807 von Shiomi et al. 1998) des Gens *CsACS1*. Zusätzlich wurden die aus den genomischen Sequenzen (321 bis 1346 bp des *CsACS1* Gens) (AF33581 Trebitsh et al. 1997) stammenden bis heute bekannten Introns (Intron I und Intron II) eingezeichnet. Die Introns bzw. der nicht translatierte Sequenzbereich wurden kleiner und nicht fett dargestellt. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *MspI*, *MboI*, *MvaI* und *Hin6I* sind farbig und mit einem Pfeil dargestellt.

3.2.6.4 Amplifikation des unbekanntem 5'-Endes der *CsACC1* Synthase mittels Splinkerette-Methode

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 3.3.5.2) ist zu vermuten, dass die bei gynözischen Genotypen zusätzliche und mit dem *Acr*-Locus korrelierte Sequenz *CsACSIG* (postuliert von TREBITSH et al. 1997, weiteres siehe Kapitel 3.1.2) am 5' Ende Sequenzunterschiede zum Gen *CsACSI* aufweist. Um diese *CsACSIG* Sequenz bei gynözischen (*MM AcrAcr*) Pflanzen zu amplifizieren, wurde eine PCR mittels Splinkerette-Methode durchgeführt (DEVON et al. 1995).

Mit Hilfe dieser Splinkerette-PCR-Methode können von bekannten Sequenzbereichen ausgehend unbekannte Sequenzabschnitte zum 5' bzw. zum 3' Ende durch die Nutzung von Restriktionsschnittstellen amplifiziert werden. In Abb. 3.8 wird das Prinzip dieser Methode für das 5' Ende dargestellt.

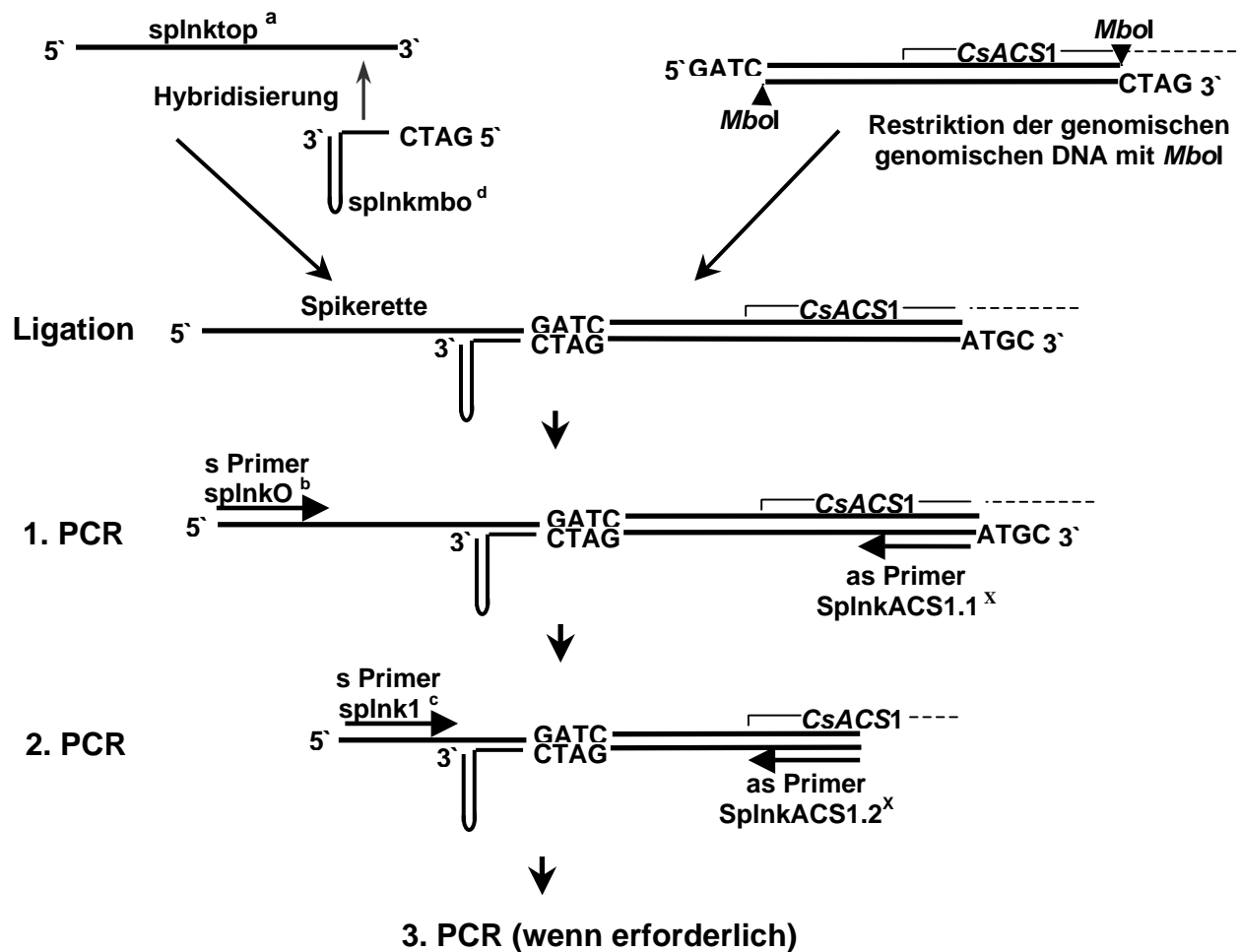


Abb. 3.8: Darstellung der Splinkerette PCR (nach DEVON et al. 1995; verändert). zur Amplifizierung des 5' Endes des Gens *CsACSI*.

→ = Primer mit entsprechender Richtung der Amplifikation; ^x: Primersequenz siehe Tab. 3.10

^a: 5' CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATTCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCCAACGAGCCAAGA `3

^b: 5' CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAA `3

^c: 5' TCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCC `3

^d: 3' AAAAACGTTTTTTTTTGGTCGGTCCTCTAG `5.

Zunächst wird ein DNA-Fragment (splntop), dessen Sequenz zwei Ankerprimerbindungssequenzen (splnk0 und splnk1) für die spätere Amplifikation enthält, mit einem zum Teil doppelsträngigen DNA-Fragment (splnmb0), das am 5'Ende eine Restriktionsenzymstimmensequenz besitzt (z.B. *MboI*), hybridisiert (siehe Abb. 3.8).

Dieser damit erstellte Adapter (Splinkerette) wird anschließend an die zuvor mit dem entsprechenden Enzym (z. B. *MboI*) restringierten genomischen DNA-Fragmente legiert. Durch Einsatz des Ankerprimers splnk0 als sense Primer und eines aus der bekannten Sequenz (z. B. *CsACSI*) stammenden antisense Primers (SplnkACS11.1) erfolgt dann die Amplifikation des unbekanntes 5'-Endes bis zur entsprechenden Restriktionsenzymstimmensequenz mittels PCR (siehe Abb. 3.8).

Zur Erhöhung der Spezifität der Amplifikation erfolgt anschließend eine zweite bzw. dritte PCR mit dem Anker Primer splnk0 als sense und weiteren spezifischen antisense Primer (z. B. SplkACS1.2) (siehe Abb. 3.8).

Die Restriktion von 5µg genomischer DNA einer gynösischen Pflanze erfolgte mit 10U des Restriktionsenzymes *MboI* mit einem Puffer nach Angabe des Herstellers über Nacht bei 37°C in einem Reaktionsvolumen von 20µl. Anschließend erfolgte eine Hitzedeaktivierung des Restriktionsenzymes bei 65°C.

Zur Herstellung der Splinkerette wurden jeweils 150pmol von splkntop und splkmb0 in einem Reaktionsvolumen von 20µl mit 10mM Tris HCl pH 7,5 und 5mM MgCl₂ zunächst für 2 Minuten auf 90°C erhitzt und anschließend für 20 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt.

Von diesem Splinkeretteansatz wurden 6µl (ca. 0,4µg) und 2µl des *MboI*-Restriktionsansatzes (ca. 0,5µg restringierte DNA) in einem 20µl Reaktionsansatz mit 400Units T₄Ligasen (New England Bioscience) und einem Puffer nach Angabe des Herstellers über Nacht bei 15°C ligiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der ligierten DNA mit dem High Pure PCR Produkt Purifications Kit nach Angaben des Herstellers (Fa. Roche). Von der in 30µl bidest H₂O aufgenommenen gereinigten und ligierten DNA wurden dann 2µl bei der ersten PCR mit dem sense Primer splk0 und dem *CsACSI* (Abb. 3.17) spezifischen antisense Primer SplnkACS1.1 (5'CGGCAAGACCCATCTGAATGATG'3) mit einer annealing Temperatur von 55°C eingesetzt.

Für die zweite PCR mit einer annealing Temperatur von 55°C (sense Primer splk1 und den antisense Primer SplnkACS1.2 (5'CCATCTGAATGATGCCGTTGGGA'3)) wurden 2µl einer 1 zu 20 Verdünnung des ersten PCR-Produktes eingesetzt. Bei der dritten PCR (annealing Temp. 55°C) mit den Primern spln1 und SplnkACS1.3 (5'GTAGGAGGAATCTTGACCGTGGG'3) wurde in identischer Weise verfahren.

Verwendete Chemikalien:

- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. MBI Fermentas)
- Tris HCl; pH 7,4
- MgCl₂
- T₄Ligasen und Puffersystem (Fa. New England Bioscience)
- High Pure PCR Produkt Purifications Kit (Fa. Roche)
- PCR Bedingungen und verwendete Chemikalien siehe oben

Nach der Auftrennung der PCR-Proben in einem Gelelektrophorese wurden die amplifizierten Banden aus dem Gel ausgeschnitten, inkloniert und sequenziert (Methoden siehe Kapitel 3.2.6.6).

Zur Bestätigung, dass sowohl die *CsACSI*, als auch die *CsACSIG* Sequenz isoliert worden sind, wurden aus den heterologen Sequenzbereichen spezifische Primer abgeleitet (Primersequenzen siehe Ergebnisse; Kapitel 3.3.5.3; Abb.3.18) und in den drei zur Verfügung stehenden genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD bei gynözischen, subgynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanzen, die zu erwartenden Amplifikationsprodukte dargestellt.

3.2.6.5 RT-PCR

Aufgrund der in Kapitel 3.1.2 vorgestellten Untersuchungsergebnisse konnte ein Expressionsunterschied der Gene *CsACSI* und *CsACS2* zwischen gynözischen und monözischen Linien nachgewiesen werden. Daher wurde auch die Expression des in der vorliegenden Arbeit erstmals isolierten Sequenz *CsACS5* (siehe Kapitel 3.3.2 bzw. 3.3.4 und Anhang 7.5, Abb. 7.2) in Blüten-, Blatt- und Wurzelgewebe mittels RT-PCR bei jeweils drei gynözischen und drei phänotypisch andrözischen Linien des genetischen Hintergrundes WrD analysiert.

Die RT-PCR wurde mittels OneStep RT-PCR Kit (Fa. Quiagen) durchgeführt. Bei diesem Kit erfolgt direkt nach der reverse Transkription die spezifische Amplifikation, so dass die vollständige Reaktion in einem Ansatz erfolgt. Der Reaktionsansatz wurde von 50µl (vom Hersteller angegeben) auf 25µl reduziert. Pro Reaktion wurden ca. 20ng RNA eingesetzt. Zur Amplifikation der Sequenz *CsACS5* wurde nach der Sequenzierung ein spezifisches Primerpaar abgeleitet (Primersequenzen siehe Kapitel 3.3.4). Die Optimierung der PCR-Bedingungen erfolgte zunächst mit genomischer DNA mittels eines Temperaturgradienten (siehe Kapitel 3.2.6).

Die Intensitäts- und Größenbestimmung erfolgte durch die Auftrennung in einem 2%igem Agarosegel mit 0,1µl Ethidiumbromid pro ml-Gellösung mittels einem Transilluminator (siehe Kapitel 3.2.6).

PCR Bedingungen:

- für den 1. Zyklus: 30 Min bei 50°C (reverse Transkription)
- für den 2. Zyklus: 15 Min bei 95°C (Deaktivierung der reversen Transkriptase bzw. Aktivierung der Polymerase)
- für 45 Zyklen:
 - 30 Sek. bei 94°C (Denaturierung)
 - 1 Min. von 44°C bis 65°C je nach Primerpaar (annealing) (siehe Tab.3.10)
 - 2 Min bei 72°C (Polymerisation)
 - 1 Zyklus bei 72°C für 20 min

3.2.6.6 Einklonierung der Fragmente, Isolierung der Plasmide und Sequenzierung

Die Konzentration des zu klonierenden Fragmentes wurde durch eine Reduktion in der Vakuumzentrifuge auf eine Konzentration von ca. 40-50ng/μl eingestellt.

Zur Klonierung wurde das TOPO TA Cloning Kit (Fa. Invitrogen) nach Herstellerangaben (Protokoll 'Low- Melt Agarose Method') verwendet. Durch die Verwendung des Plasmid Vektors (pCR[®]4-TOPO[®]) und dem Einsatz einer Topoisomerase ist keine Vorbehandlung des Fragmentes (Ligation/Polishing) notwendig.

Für die Selektion wird ein Letal Gen des Plasmids verwendet, welches bei erfolgreicher Einklonierung deaktiviert wird, so dass nur die transformierten *E. coli* Bakterien wachsen können. Von dem angegebenen Protokoll wurde für jedes einzuklonierende Fragment die Hälfte des vom Hersteller empfohlenen Reaktionsansatzes verwendet. Bei Fragmenten, die größer als 1000bp waren, wurde die Inkubationszeit mit den TOP10 One Shot Chemical Competen *E. coli* auf eine Stunde verlängert.

Die transformierten Bakterien wurden auf vorgewärmten festem LB Medium, das 100 μg/ml Ampicillin enthielt, in Petrischalen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden 5 Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in einer PCR mit T₃/T₇ Reaktionsmix (nach Herstellerangaben) auf den Erfolg der Einklonierung der Inserts getestet. Außerdem erfolgte ein erneutes Ausstreichen auf festem LB Medium mit 100 μg/ml Ampicillin und eine anschließende Inkubation über Nacht bei 37°C. Die Vermehrung der positiv getesteten Kolonien erfolgte in 5ml flüssigem LB-Medium, dem 25μg/ml Ampicillin zugesetzt wurde, über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C. Bei der anschließenden Aufreinigung der Plasmide wurden 3ml der Bakteriensuspension mittels NuclioSpin[®] Plasmid (nach Angaben des Herstellers Fa. Macherey-Nagel) isoliert und in 50μl sterilem Bideest gelöst.

Für eine mögliche spätere Nutzung der transformierten *E. coli* Bakterien wurden 2ml Bakteriensuspension mit 1ml Glycerin vermischt und nach der Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert.

Für die Sequenzierung wurden ca. 1,5 μg Plasmid DNA pelletiert und getrocknet. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech im Auftrag durchgeführt.

Verwendete Chemikalien:

- Low melting small DNA - Agarose (Fa. Biozym)
- Ethidiumbromid
- 100bp-Leiter (Fa. Pharmacia)
- Orange G-Ladepuffer (30% Glycerin, 0,25% Orange G)
- 1xTAE wie in 3.2.5
- Gelase mit Puffer (Fa. Epicentre Technologie).
- TOPO TA Cloning Kit (Fa. Invitrogen)
- Verdünnungsreihe von λ-DNA:
40, 60, 80, 100, 150, 200, 250ng
- LB Medium flüssig
1% (w/v) Tryptone
0,5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) NaCl
- LB Medium fest
wie oben außerdem:
1,5% (w/v) Agar
- Ampicillin
- Plasmidaufreinigung mit
NucleoSPIN[®] Plasmid (Fa.
Macherey-Nagel)

3.2.6.7 Analyse der Sequenzen

Die Analyse der Sequenzen wurde mit der im Internet frei zugänglicher Software Nukleotide BLAST® (ALTSCHUL et al. 1997) durchgeführt. Dieses Programm führt einen Homologievergleich auf der Basis der Nukleinsäuren in der NCBI Datenbank durch (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Der direkte Vergleich von verschiedenen Sequenzen erfolgte mit dem Programm ClustalW vom EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) (www.ebi.ac.uk/clustalw).

3.2.7 Southern-Hybridisierung

3.2.7.1 Restriktion, Elektrophorese und Übertragung der DNA auf eine Membran

Für jeden Restriktionsansatz wurden 20µg DNA und 30 units Restriktionsenzym (Fa. Gibco BRL) eingesetzt. Die enzymatische Reaktion erfolgte mit einem Puffer nach Angabe des Herstellers über Nacht bei 37°C in einem Reaktionsvolumen von 30µl. Die Restriktion wurde durch Zugabe von 3µl Bromphenolblau-Ladepuffer beendet. Die anschließende Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte elektrophoretisch in einem 0,8%igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei 2V/cm Gellänge für 14-16h. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid zur Gellösung (0,5µl/ml) konnte die restringierte und aufgetrennte DNA unter einem Transilluminator sichtbar gemacht werden (V-Licht, 302nm; Fa. Bachofer). Als Molekulargewichtsmarker diente eine 1000bp-Leiter (Fa. Gibco BRL).

Die Übertragung der DNA auf eine Hypobond™ -N⁺ Nylon-Membran (Fa. Amersham) wurde mit einem Vakuum-Blotter (Fa. Pharmacia) durchgeführt. Dazu wurde das Gel zunächst für 10min in 0,25M HCl depuriniert und anschließend mit 0,4M NaOH bei 60mbar geblottet. Nach 45min wird die Membran, um Agarosereste zu entfernen, für 10min in 2x SSC gewaschen. Die Vernetzung der DNA mit Membran ist durch das alkalische Blotten nicht notwendig. Die Filter wurden bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert.

Verwendete Chemikalien:

- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Gibco BRL)
- Bromphenolblau-Ladepuffer: 30% (v/v) Glycerin;
- 0,25% (w/v) Bromphenolblau
- Molekulargewichtsmarker: 1000bp-Leiter (Fa. Gibco BRL)
- Agarose
- Ethidiumbromid
- 1x TAE-Puffer siehe Kapitel 3.2.5
- 0,25M HCl
- 0,4M NaOH
- 2x SSC, Stammlösung (20x):
3M NaCl;
0,3M Na₃-Citrat

3.2.7.2 Radioaktive Markierung der Sonden, Southern-Hybridisierung und Autoradiographie

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit dem Oligolabelling Kit der Fa. Gibco BRL mittels "random priming". Dafür wurden 50ng Sonden-DNA für 5min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nachdem je 2 µM der drei Oligonukleotide dGTP, dATP und dTTP, 3 Units Klenow-Enzym (3U/µl) ad 70µl steriles bi-dist. Wasser und Reaktionspuffer nach Angaben der Hersteller hinzugefügt wurden, erfolgt die Zuführung der Radioaktivität in Form von 1480MBq α 32P-dCTP (Fa. Amersham, 110TBq/mmol). Der Ansatz wurde dann für 3h bei 25°C inkubiert und anschließend wiederum für 5min bei 95°C denaturiert und 5min auf Eis abgekühlt.

Für die Hybridisierung, die in Glasröhren in einem Hybridisierungssofen (Fa. Bachofer) erfolgt, werden pro Röhre bis zu drei Nylonmembranen in 30ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 65°C prähybridisiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde in die Hybridisierungsröhre pipettiert und diese im Hybridisierungssofen bei 65°C über Nacht inkubiert. Zur Abtrennung der nicht hybridisierten Sonden-DNA wurden die Membranen zweimal 15min mit 200ml 2x SSC, 0,5% SDS und einmal mit 1x SSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Auf die mit Frischhaltefolie abgedeckte Membran wurde anschließend ein Fuji RX-Röntgenfilm gelegt und bei -80°C für 2-14 Tage (in Abhängigkeit zu der verbliebenen Radioaktivität) exponiert. Nach Rehybridisierung der Membranen durch Aufkochen für 15min in 0,5% SDS konnten sie für weitere Southern-Hybridisierungen eingesetzt werden. Die Röntgenfilme wurden nach der Exponierung in einer Dunkelkammer entwickelt. Dafür wurden die Filme zunächst in den Entwickler (Fa. Tetanal; 440ml Entwickler + 1650 ml Wasser) gelegt, bis eine optimale Intensität der Signale erreicht war, und anschließend erfolgte die Fixierung für ca. 5 Minuten (Fa. Tetanal; 400ml Fixierer + 1600ml Wasser). Die fixierten Filme wurden mit Wasser abgespült und in einem Heißluftschrank getrocknet.

Verwendete Chemikalien:

- Hybridisierungslösung:
 - 0,25M NaHPO₄
 - 0,25M NaCl
 - 1mM EDTA
 - 7% (v/v) SDS
- Oligolabelling Kit (Fa. Pharmacia)
- α ³²P-dCTP (Fa. Amersham)
- Fuji-X-Ray Röntgenfilme
- 2x SSC:
 - 3M NaCl
 - 0,3M Na₃-Citrat

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Charakterisierung des *Acr/acr*- Locus in den genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD

3.3.1.1 Kreuzungsanalysen

Die in Tabelle 3.7 dargestellten Boniturergebnisse der Ausgangslinien (Abb. 3.2 in Kapitel 3.2.1) zeigten nur zum Teil die erwarteten Aufspaltungen.

Bei dem verwendeten Pflanzenmaterial konnten die monözischen Geschlechtstypen von den subgynözischen Geschlechtstypen phänotypisch nicht eindeutig unterschieden werden, so dass diese Pflanzen im Folgenden zu einem Geschlechtstyp zusammengefasst dargestellt werden.

Die Linien 1, 5 und 9 in Tab. 3.7, die entweder aus einer gynözischen Geschwisterkreuzung (WrD und ECD) oder aus einer gynözischen Selbstung (ED) entstanden sind, zeigten eine erwartungsgemäß reine gynözische Nachkommenschaft.

Die F₁ Nachkommenschaften der genetischen Hintergründe WrD und ED zeigten nicht die erwartete einheitlich gynözische (vollständige Dominanz des *Acr/acr* Gens) bzw. subgynözische (unvollständige Dominanz des *Acr/acr* Gens) Nachkommenschaft (Tab. 3.7; Linie 2 und 6). Stattdessen wurde eine Aufspaltung von gynözischen und monözischen bzw. subgynözischen Pflanzen nachgewiesen. Lediglich bei der F₁ Nachkommenschaft des genetischen Hintergrundes ECD wurde eine erwartete einheitlich gynözisch blühende Nachkommenschaft nachgewiesen (Tab. 3.7; Linie 10), so dass bei dem genetischen Hintergrund zunächst ECD eine vollständige Dominanz des *Acr/acr* Locus angenommen werden könnte.

Bei allen analysierten F₂ Nachkommenschaften (Tab. 3.7; Linie 3, 7 und 11) traten eine unerwartet hohe Anzahl von andrözischen Pflanzen auf. Bei einer Aufspaltung des *Acr/acr*- und des *A/a*-Locus ist bei einer Selbstungsnachkommenschaft ein Anteil von 1/16 andrözischer Pflanzen zu erwarten. Bei allen F₂-Nachkommenschaften wurde jedoch ein Anteil von 1/3 (Linie 3) bzw. 1/5 (Linie 7 und 11) andrözischer Pflanzen nachgewiesen (Tab. 3.7). Außerdem zeigte sich in allen F₂ Nachkommenschaften eine zu geringe Anzahl von monözischen bzw. subgynözischen Pflanzen. Bei der Annahme, dass sowohl die subgynözischen (*MM Acracr*) als auch die monözischen (*MM acracr A.*) Genotypen in dieser Gruppe erfasst wurden, sollte mindestens 11/16 der Nachkommenschaft einen monözischen bzw. subgynözischen Geschlechtstyp aufweisen. Es wurden jedoch lediglich 1/3 (Linie 3 und 7, Tab 3.7) monözisch und subgynözisch blühende Pflanzen in den F₂ Nachkommenschaften der genetischen Hintergründe WrD und ECD nachgewiesen. In der F₂ Nachkommenschaft des genetischen Hintergrundes ED zeigten sich weniger als 1/5 (Linie 11) mit monözischen bzw. subgynözischen Geschlechtstyp (Tab 3.7).

Tab. 3.7 : Darstellung am *Acr/acr* Locus aufspaltenden Nachkommenschaften der drei genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD.

gen. Hint.	Linie	Kreuzung	Geschl.-typ	erw. Aufspaltung ^x		gefundene Aufspaltung
				vollst. Dominanz	unvollst. Dominanz	
WrD	1	♀ x ♀	♀	40	40	40
	2	F ₁ (♀ x ♂ ♀)	♀	60	-	28
			♀ (♂)	-	60	32 ^z
			♂ ♀	-	-	
	3	F ₂ (♀ x ♂ ♀)	♀	45	15	22
			♀ (♂)	-	30	17 ^z
			♂ ♀	15 ^y	15 ^y	
			♂	-	-	21
	4	F ₃ (♂ ♀ x S)	♀	-	-	11
			♀ (♂)	-	-	27 ^z
			♂ ♀	51 ^y	51 ^y	
			♂	-	-	13
ED	5	♀ x S	♀	40	40	40
	6	F ₁ (♀ x ♂ ♀)	♀	50	-	27
			♀ (♂)	-	50	23 ^z
			♂ ♀	-	-	
	7	F ₂ (♀ x ♂ ♀)	♀	45	15	19
			♀ (♂)	-	30	20 ^z
			♂ ♀	15 ^y	15 ^y	
			♂	-	-	21
8	F ₃ (♂ ♀ x S)	♀	-	-	8	
		♀ (♂)	-	-	19 ^z	
		♂ ♀	30 ^y	30 ^y		
		♂	-	-	3	
ECD	9	♀ x ♀	♀	40	40	40
	10	F ₁ (♀ x ♂ ♀)	♀	58	-	58
			♀ (♂)	-	58	-
			♂ ♀	-	-	-
	11	F ₂ (♀ x ♂ ♀)	♀	28,5	9,5	21
			♀ (♂)	-	19	8 ^z
			♂ ♀	9,5 ^y	9,5 ^y	
			♂	-	-	9
	12	F ₃ (♂ ♀ x S)	♀	-	-	34
			♀ (♂)	-	-	12 ^z
			♂ ♀	56 ^y	56 ^y	
			♂	-	-	10

*: χ^2 -Wert signifikant abweichend bei P= 5%

x: Erwartete Aufspaltungen siehe Rückkreuzungsprogramm, Abb. 3.2 in Kapitel 3.2.1

y: ¼ der monözischen Pflanzen könnte aufgrund einer zusätzlichen Aufspaltung am A/a-Locus einen andrözischen Phänotyp zeigen, da alle F₂- bzw. F₃-Nachkommenschaften aus einer Selbstung stammen

z: subgynöische (♀(♂)) und monözische (♂♀) Pflanzen können innerhalb der Nachkommenschaften phänotypisch nicht unterschieden werden.

S = Selbstung; ♀ = gynözisch; ♀(♂) = subgynözisch; ♂♀ = monözisch; ♂ = andrözisch.

Auch die F₃-Nachkommenschaften, die aus Selbstungen monözischer Pflanzen entstanden sind, zeigten nicht eine erwartete rein monözische bzw. beim Aufspalten des *A/a* Gens eine monözisch : andrözisch (3:1) Nachkommenschaft. Stattdessen wurden bei allen F₃-Nachkommenschaften gynözische, subgynözische, monözische und andrözische Phänotypen nachgewiesen (Tab 3.7; Linie 4, 8 und 12). Damit wurden unerwartet gynözische und zu viele andrözische Phänotypen in den F₃ Nachkommenschaften beobachtet.

Bei der Beschreibung des Pflanzenmaterials (siehe Kapitel 3.2.1 und 2.2.1.1) wurde bereits auf die Möglichkeit hingewiesen, dass bei determinierten Linien genotypisch monözische Pflanzen eine andrözische Geschlechtsausprägung zeigen können (GÖNEN 1975 und FRANKEN 1979). Damit könnten die bonitierten andrözischen Pflanzen auch genotypisch monözisch (*MM acracr A.*) sein, so dass eine erhöhte Anzahl andrözischer Pflanzen bei gleichzeitiger Abnahme der monözischen Geschlechtstypen erwartet werden kann. Aufgrund dieser Besonderheit des Pflanzenmaterials können 1/4 andrözische Geschlechtstypen in der F₂ Nachkommenschaft erwartet werden. Damit wäre ein Spaltungsverhältnis der F₂ Nachkommenschaften von 3:1 (gynözisch (subgynözisch/monözisch) : andrözisch) zu erwarten. Dieses Spaltungsverhältnis wurde bei allen untersuchten F₂ und F₃-Nachkommenschaften bestätigt (Tab. 3.8, Linie 3, 4, 7, 8, 11 und 12).

Da das *Acr/acr*-Gen jedoch eine unvollständige Dominanz aufweisen kann, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die am *Acr/acr* Locus heterozygoten Genotypen phänotypisch einen anderen Geschlechtstyp als die homozygoten aufweisen. Folglich ist zu vermuten, dass die zuvor zusammengefasste Gruppe der gynözischen und monözischen bzw. subgynözischen im Verhältnis 1:2 aufspaltet. Die damit entstehende Aufspaltung von (1:2:1) (gynözisch : subgynözisch (monözisch) : phänotypisch andrözisch) ist jedoch bei den analysierten F₂-Nachkommenschaften signifikant abweichend (Tab. 3.8; Linie 3, 7 und 11).

Tab. 3.8: Darstellung der phänotypischen Aufspaltung der zu analysierenden Ausgangslinien.

gen. Hint.	Kreuzung	Linie	phän. Aufspaltung			Verhältnis	χ^2 -Wert	Verhältnis	χ^2 -Wert
			♀	♂♀	♂				
WrD	♀ x ♀	1	40	--	--	--	--	--	--
	F ₁ (♀ x ♂♀)	2	28	32	--	1 : 1	0,267	--	--
	F ₂ (♀ x ♂♀)	3	22	17	21	3 : 1	3,2	1 : 2 : 1	11,3*
	F ₃ (♂♀ x S)	4	11	27	13	3 : 1	0,006	1 : 2 : 1	0,346
ED	♀ x S	5	40	--	--	--	--	--	--
	F ₁ (♀ x ♂♀)	6	27	23	--	1 : 1	0,391	--	--
	F ₂ (♀ x ♂♀)	7	19	20	21	3 : 1	3,2	1 : 2 : 1	6,8*
	F ₃ (♂♀ x S)	8	8	19	3	3 : 1	3,6	1 : 2 : 1	3,8
ECD	♀ x ♀	9	40	--	--	--	--	--	--
	F ₁ (♀ x ♂♀)	10	58	--	--	--	--	--	--
	F ₂ (♀ x ♂♀)	11	21	8	9	3 : 1	0,035	1 : 2 : 1	20,3*
	F ₃ (♂♀ x S)	12	34	12	10	3 : 1	1,52	1 : 2 : 1	38,8*

*: χ^2 -Wert signifikant abweichend bei P= 5%.

Da keine Differenzierung zwischen monözischen und subgynözischen Geschlechtstypen möglich ist, könnte zur Herstellung der F₃-Nachkommenschaften anstatt einer monözischen (*MM acracr A.*) eine subgynözischen Pflanze geselbstet worden sein. Damit wäre auch für die F₃-Nachkommenschaft eine mit der F₂-Nachkommenschaft identische Aufspaltungen zu erwarten. Diese Aufspaltung wurde bei allen F₃-Nachkommenschaften bestätigt (Tab. 3.8; Linie 4, 8 und 12). Es zeigten sich jedoch bei den F₃-Nachkommenschaften der genetischen Hintergründe WrD und ED im Vergleich zu den F₂-Nachkommenschaften ein geringerer Anteil andrözischer Pflanzen, so dass sowohl eine 1 : 2 : 1 als auch eine 3 : 1 Aufspaltung bestätigt werden kann (Tab. 3.8, Linie 4 und 8). Lediglich für die F₃-Nachkommenschaft des genetischen Hintergrundes ECD ist eine 1 : 2 : 1 Aufspaltung abzulehnen und eine 3 : 1 Aufspaltung zu bestätigen (Tab. 3.8, Linie 12). Dieses Ergebnis könnte, mit der nachgewiesenen rein weiblichen F₁ Nachkommenschaft (Tab. 3.8 Linie 10) ein Hinweis für eine fast vollständige Dominanz des *Acr/acr* Locus sein.

In den Nachkommenschaften der genetischen Hintergründe WrD und ED ist aufgrund der Spaltungsergebnisse eine unvollständige Dominanz des *Acr/acr* Gens zu vermutet. Diese unvollständige Dominanz scheint jedoch nur in den F₃-Nachkommenschaften (Bestätigung der 1:2:1) unabhängig ausgeprägt zu werden. In den F₂-Nachkommenschaften, bei denen keine 1:2:1 nachgewiesen werden konnte, müssen weitere Faktoren die Dominanz des *Acr/acr* Locus beeinflussen. Zur Aufklärung der Dominanz des *Acr/acr* Locus muss geklärt werden ob gynözische Phänotypen mit einem heterozygoten *Acr/acr* Locus auftreten. Außerdem ist eine phänotypische Unterscheidung zwischen den monözischen (*acracr MM A.*) und subgynözischen (*Acracr MM*) Pflanzen notwendig. Um diese Genotypen bzw. Phänotypen unterscheiden zu können, wurden innerhalb der genetischen Hintergründe WrD und ED verschiedene Testkreuzungen zwischen den Pflanzen des Ausgangsmaterials durchgeführt.

Die Spaltungsergebnisse der Testkreuzungen innerhalb der genetischen Hintergründe WrD und ED sind in Tab. 3.9 dargestellt. Die Boniturergebnisse der einzelnen Nachkommenschaften werden im Anhang 7.4, Tab. 7.27 und Tab. 7.28 dargestellt. Da keine Differenzierung zwischen den monözischen und den subgynözischen Pflanzen möglich ist, werden zunächst alle gemischt blühenden Pflanzen (männliche und weibliche Blüten) als monözisch (♂ ♀) bezeichnet.

Die Analyse der gynözischen und monözischen Pflanzen der F₁ Nachkommenschaft (Tab. 3.7; Linien 2 und 6) durch eine Rückkreuzung mit einer definiert gynözischen Pflanze zeigten, dass die verwendeten monözischen Phänotypen wahrscheinlich heterozygot und die gynözischen Phänotypen homozygot dominant am *Acr/acr*-Locus waren. So wurde für die Nachkommenschaften der Kreuzungen A in beiden genetischen Hintergründen eine signifikante Aufspaltung von 1 : 1 (gynözischer : monözischer) (siehe Tab. 3.9 A; WrD und ED) und für die Kreuzungen B eine rein gynözische Nachkommenschaft (siehe Tab. 3.9 B; WrD und ED) nachgewiesen.

Diese am *Acr/acr*-Locus homozygot dominanten gynözischen und heterozygoten subgynözischen Genotypen könnten auch bei den F₂-Nachkommenschaften des genetischen Hintergrundes WrD (Tab. 3.8; Linie 3) durch die Testkreuzungen E (1:1; gynözisch:monözisch) und C (rein gynözisch) vermutet werden (Tab. 3.9, Kreuzung E und C; WrD). Die entsprechenden Testkreuzungen innerhalb des genetischen Hintergrundes ED zeigten jedoch stets eine 1:1 (gynözisch : monözisch) Nachkommenschaft (Tab. 3.9, Kreuzung E und C; ED), so dass für die verwendeten gynözischen Pflanzen ein heterozygote *Acr/acr* Locus zu vermuten ist.

Die Kreuzung von monözischen Pflanzen aus der F₃ Nachkommenschaft mit def. gynözischen Pflanzen des genetischen Hintergrundes WrD (siehe Tab. 3.9, G, WrD) führen zu Nachkommenschaften mit einer signifikanten Aufspaltung von 1:1 (gynözisch:monözisch). Damit ist auch für diese monözischen Phänotypen im genetischen Hintergrund WrD ein heterozygoter *Acr/acr*-Locus vermutet werden (siehe Tab. 3.9, G, WrD). Die im genetischen Hintergrund WrD nachgewiesene Aufspaltung von 1:1 (gynözisch:monözisch) konnte bei vergleichbaren Kreuzungen innerhalb des genetischen Hintergrundes ED nur bei einer Nachkommenschaft nachgewiesen werden (Tab. 3.9 G1, ED). Bei allen weiteren Kreuzungen dieser Art wurde im genetischen Hintergrund ED eine rein gynözische Nachkommenschaft nachgewiesen (siehe Tab. 3.9; G, ED).

Tab. 3.9: Nachkommenschaften der Testkreuzungen.

Art der ^x Kreuzung	Kreuzung ^z	gen. Hinter.	phän. Aufspaltung			Verhältnis	χ^2 -Wert
			♀	♂♀	♂		
def. gynözisch ♀ X monözisch ♂♀ aus F ₁ (♂♀ x ♀)	A	WrD	17	17	-	1 : 1	0
		ED	12	17		1 : 1	0,86
gynözisch ♀ aus F ₁ (♂♀ x ♀) X def. gynözisch ♀ ^y	B	WrD	24	-	-		-
		ED	19	-	-	-	-
gynözisch ♀ aus F ₂ (♂♀ x ♀) X def. gynözisch ♀ ^y	C	WrD	24	-	-	-	-
		ED	9	9	-	1 : 1	0
def. gynözisch ♀ X andrözisch ♂ aus F ₂ (♂♀ x ♀)	D	WrD	9	50	-	1 : 3	2,87
	D1	ED	(1)	58	-	-	-
			3	10	-	1 : 3	0,86
def. gynözisch ♀ X monözisch ♂♀ aus F ₂ (♂♀ x ♀)	E	WrD	79	68	-	1 : 1	0,82
		ED	31	23	-	1 : 1	1,15
def. gynözisch ♀ X andrözisch ♂ aus F ₃ (♂♀ x S)	F	WrD	-	23	-	-	-
	F2	ED	7	35	-	1 : 3	1,55
			-	20	-	-	-
def. gynözisch ♀ X monözisch ♂♀ aus F ₃ (♂♀ x S)	G	WrD	15	10	-	1 : 1	1,0
		G1	ED	31	(2)	-	-
			7	7	-	1 : 1	0

^x : weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.3, 3.4 und 3.5 in Kapitel 3.2.2)

^y : bei diesen Pflanzen wurden mit AgNO₃ männliche Blüten induziert

^z : Summe von zwei bis vier Kreuzungsnachkommenschaften. Boniturergebnisse der einzelnen Nachkommenschaften siehe Anhang 7.4 in Tab. 7.27.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl in der F₂- als auch in der F₃-Nachkommenschaft des genetischen Hintergrundes ED gynözische Phänotypen auftreten, die

am *Acr/acr*-Locus heterozygot waren. Folglich ist für den genetischen Hintergrund ED sowohl eine vollständige als auch eine unvollständige Dominanz des *Acr/acr* Gens zu beobachten. Dass diese unterschiedliche Ausprägung des *Acr/acr* Locus auch im genetischen Hintergrund WrD zu beobachten ist, zeigten die Nachkommenschaften der Kreuzungen zwischen andrözischen Phänotypen aus der F₂-Nachkommenschaft und def. gynözischen Pflanzen (Tab.3.9, D, WrD). So konnte im genetischen Hintergrund WrD bei allen Nachkommenschaften der Kreuzungen D eine signifikante Aufspaltung von 1:3 (gynözisch:monözisch) nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.9; D; WrD). Da diese Nachkommenschaften am *Acr/acr*-Locus einheitlich heterozygot sind, kann diese 1:3 Aufspaltung nur durch weitere Einflüsse erklärt werden.

Die Nachkommenschaften, die aus Kreuzungen mit andrözischen Phänotyp der F₃ Nachkommenschaft des genetischen Hintergrundes WrD entstanden sind, wiesen dagegen eine rein monözische Geschlechtsausprägung auf (Tab. 3.9 F; WrD), so dass bei diesen Nachkommenschaften kein Einfluss auf die Ausprägung der Dominanz des *Acr/acr* Gens zu beobachten war.

Auch die vergleichbaren Testkreuzungen innerhalb des genetischen Hintergrundes ED weisen sowohl Nachkommenschaften mit einer 1:3 (gynözisch:monözisch) (Tab. 3.9 D1 und F; ED) oder eine rein monözische Geschlechtsausprägung auf (Tab. 3.9 D und F2; ED).

Die Kreuzungsanalysen deuten darauf hin, dass wahrscheinlich alle monözisch bonitierten und zu Testkreuzungen eingesetzten Pflanzen am *Acr/acr* Locus heterozygot waren (siehe Kreuzungen A, E und G in Tab. 3.9). Jedoch wurden in beiden genetischen Hintergründen weitere Einflüsse auf die Ausprägung der Weiblichkeit nachgewiesen (Tab. 3.9, Kreuzungen C, D, F und G). Folglich bleibt auch nach den Testkreuzungen die Frage bestehen, ob die abweichenden Aufspaltungen der verwendeten Linien (Tab. 3.7, 3,8 und 3,9) nur durch das *Acr/acr* Gen oder durch weitere im genetischen Hintergrund aufspaltende Gene entstanden sind.

3.3.1.2 RFLP-Analysen

Um die verwendeten Ausgangslinien der genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD (Tab. 3.7) molekulargenetisch am *Acr/acr*-Locus zu charakterisieren, wurden einige Pflanzen mit unterschiedlicher Geschlechtsausprägung aus den Nachkommenschaften mit dem von (TREBITSH et al. 1997) entwickelten RFLP-Marker getestet. Dieser RFLP-Marker zeigt bei der Enzym/Sonden Kombination von *MspI/acs1.1* ein zusätzliches Hybridisierungssignal von 3,4kb bei Genotypen mit einem dominanten *Acr*-Allel und kann damit als ein dominant/rezessiven Marker, der zu 100% mit dem *Acr*-Allel gekoppelt ist (TREBITSH et al. 1997), genutzt werden.

Die Hybridisierungsmuster einiger Pflanzen der Nachkommenschaften 1, 2 und 3 sind als Beispiel in Abb. 3.9 dargestellt. Während bei allen Geschlechtstypen eine 2,5kb und ein 0,9kb

Bande hybridisierte, zeigte sich bei den Pflanzen mit weiblichen Blüten ein zusätzliches Hybridisierungssignal bei 3,4kb (siehe Abb. 3.9).

Bei allen der 32 analysierten gynözischen Pflanzen der 11 verschiedenen Nachkommenschaften (siehe Linie 1 bis 11 in Tab. 3.7) konnte ein zusätzliches Hybridisierungssignal bei 3,4kb nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.10). Dieses 3,4kb Hybridisierungssignal konnte jedoch bei keiner der analysierten 15 andrözischen Pflanzen nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.14).

Jedoch zeigten auch alle 40 untersuchten monözischen Pflanzen der verschiedenen Nachkommenschaften das zusätzliche 3,4kb Fragment (Tab. 3.10).

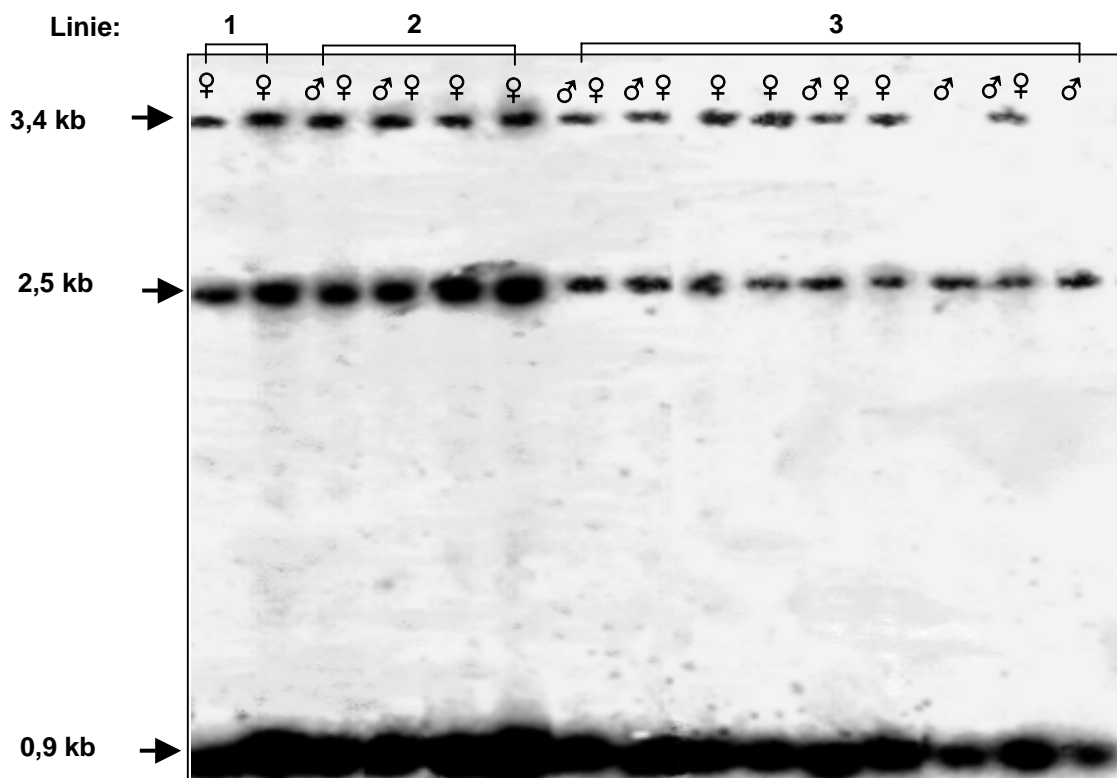


Abb. 3.9 : Darstellung des Hybridisierungsmusters gynözischer, monözischer und andrözischer Pflanzen der Linien 1, 2 und 3 des genetischen Hintergrundes WrD (siehe Tab. 3.7) beim Einsatz der Enzym/Sonden Kombination von *MspI/acs1.1*.

Damit konnte der aufgrund der Testkreuzungen (Kapitel 3.3.1.1) bereits vermutete heterozygote *Acr/acr* Locus bei allen monözisch blühenden Pflanzen bestätigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln alle gemischt blühenden Pflanzen (männliche und weibliche Blüten) als subgynözische ($\varphi(\sigma)$) bezeichnet, da es sich um Genotypen mit heterozygoten *Acr/acr* Locus handelt.

Mit Hilfe der RFLP-Analysen konnte damit der Nachweis erbracht werden, dass alle untersuchten gynözischen und alle monözisch blühenden Pflanzen entweder homozygot dominant oder heterozygot am *Acr/acr*-Locus waren. Da keine am *Acr/acr* Locus rezessiven monözischen Pflanzen nachgewiesen werden konnten und alle andrözischen Pflanzen einen rezessiven *acr*-Locus aufwiesen, ist zu vermuten, dass die *acr/acr* Genotypen im untersuchten

Pflanzenmaterial nicht monözisch, sondern andrözisch blühen. Damit konnte beim verwendeten Pflanzenmaterial die Wirkung des *A/a* Gens nicht untersucht werden.

Tab. 3.10 : Zusammengefasste Darstellung der RFLP-Analysen der Ausgangslinien 1 bis 11 (genetische Hintergründe: WrD, ED und ECD) (weitere Informationen zu den Ausgangslinien siehe Tab. 3.7 in Kapitel 3.3.1).

WrD			ED			ECD		
Linie	Phänotyp	Hybm.	Linie	Phänotyp	Hybm.	Linie	Geschl.	Hybm.
1	♀	+	5	♀	+	9	♀	+
	♀	+		♀	+		♀	+
	♀	+		♀	+		♀	+
	♀	+		♀	+		♀	+
2	♂♀	+	6	♂♀	+	10	♀	+
	♂♀	+		♂♀	+		♂♀	+
	♀	+		♀	+		♀	+
	♀	+		♂♀	+		♂♀	+
	♀	+		♀	+		♂♀	+
	♂♀	+		♂♀	+		♀	+
♀	+	♀	+	♀	+			
3	♂♀	+	7	♂	-	11	♂♀	+
	♂♀	+		♂♀	+		♀	-
	♀	+		♂	-		♂♀	+
	♀	+		♂♀	+		♂♀	+
	♂♀	+		♀	+		♂♀	+
	♀	+		♂♀	+		♂	-
	♂♀	+		♂♀	+		♀	-
	♂♀	+		♂♀	+		♂♀	+
	♂	-		♂♀	+		♂♀	+
	♂♀	+		♂♀	+		♂♀	+
	♂	-		♂	-		♂	-
♂♀	+	♂♀	+	♂♀	+			
♂	-	♂♀	+	♂♀	+			
4	♂♀	+	8	♂	-			
	♂	-		♂♀	+			
	♂	-		♂♀	+			
	♂♀	+		♂♀	+			
	♂♀	+		♂♀	+			
	♂	-		♂	-			
	♀	+		♀	+			
♀	+	♂♀	+					

Hybm. = Hybridisierungsmuster (+ = Bande bei 3,4 kb; - = keine Bande bei 3,4kb) (Beispiele einiger Hybridisierungsmuster der Linien 1, 2 und 3 siehe Abb. 3.7).

3.3.2 Isolierung unbekannter ACC-Synthasen bei *Cucumis sativus* L.

Durch den Einsatz degenerierter Primer konnten zum einen die bereits bekannten für ACC-Synthasen kodierenden Gene *CsACS1*, *CsACS2*, *CsACS3* und *CsACS4* (siehe Tab. 3.1 in Kapitel 3.1.2) amplifiziert werden. Zum anderen gelang es, zwei weitere ACC-Synthase ähnliche Sequenzen, die in der vorliegenden Arbeit als *CsACS5* und *CsACS6* bezeichnet

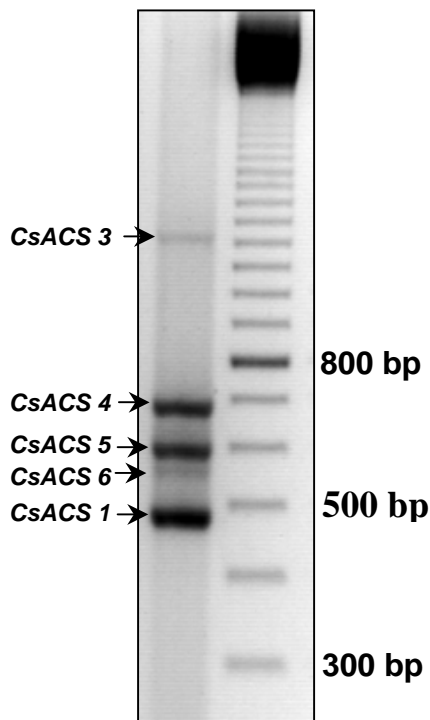


Abb. 3. 10: Beispiel der Amplifikation von verschiedenen ACC-Synthasegenen durch den Einsatz der degenerierten Primer ACSd1s und ACSd1as (erwartete Größen siehe Tab. 3.4 und Text).

werden, zu amplifizieren und zu isolieren (Sequenzen siehe Anhang 7.5 Abb. 7.1 und Abb. 7.2).

In Abb. 3.10 ist ein Beispiel der Amplifikation verschiedener ACC-Synthase-Gene dargestellt. Die bekannten Gene *CsACS1* (728bp), *CsACS3* (918bp) und *CsACS4* (1469bp) wurden mit den erwarteten Größen amplifiziert (siehe Tab. 3.4 in Kapitel 3.2.6.1).

Die Homologieanalyse (NCBI Datenbank) der in Abb. 3.10 als *CsACS6* (573bp) bezeichneten Sequenz zeigte eine Homologie von 52bp zum Gen *ACS3* (*Betula pentula*) mit der Genbankakzessionsnummer AY120899. Da der Homologiegrad zu bekannten ACC-Synthasen gering ist und keine Expression dieser Sequenz nachgewiesen werden konnte, erfolgte keine weitere Charakterisierung.

Die Analyse des in Abb. 3.10 als *CsACS5* bezeichneten Sequenz zeigt eine Homologie von 86% zu einem ACC-Synthase-Gen von *Cucumis melo* mit der Genbankakzessionsnummer Y12008 (NCBI Datenbank).

Diese erstmals in der vorliegenden Arbeit isolierte Sequenz *CsACS5* zeigte beim Homologievergleich mit den bereits veröffentlichten ACC-Synthase-Genen der Gurke eine Homologie von 53% (*CsACS2*) bis zu 76% (*CsACS1*) (Homologievergleich siehe Anhang 7.5; Abb. 7.4).

In Abb. 3.11 ist ein Homologievergleich auf Aminosäureebene zwischen den Genen *CsACS1* und *CsACS5* dargestellt. Dabei zeigt sich, dass einige Sequenzabschnitte der Gene eine sehr hohe Homologie aufweisen. Diese Homologie konnte auch auf der Ebene der mRNA nachgewiesen werden (Homologievergleich siehe Anhang 7.5; Abb. 7.3), so dass ein identisches Hybridisierungsmuster bei der Nutzung von *CsACS1* bzw. *CsACS5* homologen Sonden erwartet werden könnte (weiteres siehe Kapitel 3.3.3).

Die beiden Sequenzen (*CsACS1* und *CsACS5*) unterscheiden sich jedoch in der Anzahl und Größe der Introns. So wurden für das Gen *CsACS5* insgesamt drei Introns mit einer Gesamtlänge von 366bp detektiert (siehe Anhang 7.5; Abb. 7.2). Zum Vergleich dazu wurden bei dem Gen *CsACS1* lediglich zwei Introns mit einer Gesamtlänge von 231bp nachgewiesen

(siehe Abb. 3.7 in Kapitel 3.2.6.3), so dass der auch in Abb. 3.10 zu erkennende Größenunterschied von ca. 130bp erklärt werden kann. Außerdem wurde beim Homologievergleich der genomischen Sequenzen im Bereich der Introns keine Homologie nachgewiesen. Dennoch wird in dem Kapitel 3.3.3 neben dem Gen *CsACS2* auch das neu isolierte Gen *CsACS5* in die Southern-Hybridisierungen und Expressionsanalysen mit einbezogen.

```

CsACS5 -----QMGLAENQLCFDVVEKWLE 19
CsACS1 MKMLSTKATCNSHGQDSSYFLGWEAYEKNPFDETSNPNGIIQMGLAENQLSFDLLESWLT 60
          *****.*:::.*.**

CsACS5 ENPNSAGFKRDGKSIFRQLALFQDYNGLPAFKKVALAEFMSEIRGNKVAFDPNHIVLTAG 79
CsACS1 KNPDAASFVKRDGKSIFRELALFQDYHGLPAFKK-ALVEFMAEIRGNKVTFEANNIVLTAG 119
          :*::*.******:*****:***** **.**:*****:*.:*:*****

CsACS5 ATSANETLMFCLAEFGDAFLLPTPYYPGFDRDLKWRTGIEIVPIHCSSSNGFKITESALL 139
CsACS1 ATSANETLMFCLAEAGDAFLLPTPYYPGFDRDLKWRTGVEIVPIHCTSSNGFQVTQPALE 179
          *****.******:*****:*****:*****:*.:**

CsACS5 EAYQNALNCNLKVKGLVLTNPNSNPLGTTISSHELNRLQLFIESKNLHLISDEIYSGTAFR 199
CsACS1 QAYQEAQARNLRVKGLVLTNPNSNPLGTTMTRNELDLVDFITSKGIHLISDEIYSGTVFG 239
          :*::* **.******: :*::* :*:** **.*:*****.*

CsACS5 NSGFVSAMEIILNQTYKHNHQIQNVHIVYSLSKDLGLPGFRVGLYSDKVVVAAATKMS 259
CsACS1 SPGFVSAMEVLKERSNEDEEVWKRHVIVYSLSKDLGLPGFRVGLIYSNDEMVAATKMS 299
          ..*****:*.: :.:.: :*:*****:*****:*****

CsACS5 SFGLVSSQTQYLLSAMLSDKKFRRKYIRKNQKRLEKRQTMLVNGLEKAGIKCHKGNAGLF 319
CsACS1 SFGLVSSQTHYLLSAMLSDKKFTRTYISENQKRLKQRKMLVSGLEKAGIKCLESSAGLF 359
          *****:***** *.* :*****:*.**.* ***** :.*****

CsACS5 CWVDMRHLLGGNTFESEMELWRKILFEVRLNVSPGQSCHCSEPGWFSVCLP----- 370
CsACS1 CWVDMRHLLSDFECELKLWKKIVYEVGLNISPGSSCHCTEPGWFRVCFANMSQSTLKL 419
          ***** .:***.*::*:*:*:** **:***.******:***** **.*

```

Abb. 3.11 :Vergleich der Aminosäuresequenz des Gens *CsACS1* und des neu isolierten Gens *CsACS5*

* = identische Aminosäure, : = zwei Nukleotide des für die Aminosäuren kodierenden Triplets sind identisch, . = ein Nukleotid des für die Aminosäuren kodierenden Triplets ist identisch
 Nukleinsäuresequenz des Gens *CsACS5* siehe Anhang 7.5; Abb. 7.2 und Abb. 7.3 (mRNA)
 Homologievergleich zwischen *CsACS5* und allen bekannten ACC-Synthasen siehe Abb. 7.4.

3.3.3 Hybridisierungstudien mit *CsACS2* und *CsACS5* homologen Sonden bei gynözischen, subgynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanzen

Zur Analyse des Gens *CsACS2* und der Sequenz *CsACS5* erfolgten Southern-Hybridisierungen mit gynözischen (*MM AcrAcr*), subgynözischen (*MM Acracr*) und phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Pflanzen der genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD.

In Abb. 3.12 ist ein Beispiel für eine Hybridisierung mit der Enzym/Sonden Kombination *MspI/acs5.2* dargestellt. Alle untersuchten Pflanzen zeigten eine 0,3kb und eine 2,9kp Bande, so dass mittels der *CsACS5* homologen Sonde keine Polymorphismen zwischen den Geschlechtstypen nach einer *MspI* Restriktion nachgewiesen werden konnte.

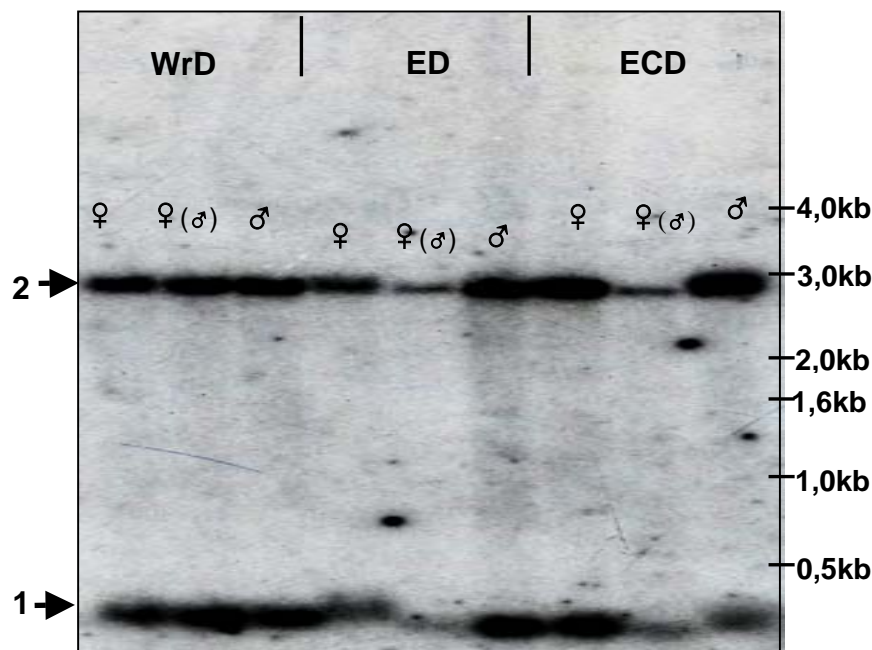


Abb. 3.12: Darstellung der Hybridisierungsmuster von gynözischen, subgynözischen und andrözischen Pflanzen der Genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD mit der Enzym/Sonden Kombination *MspI/acs5*.

Pfeil 1: Hybridisierungssignal bei 348bp (siehe auch Sequenz des Gens *CsACS5* in Anhang 7.5; Abb. 7.2

Pfeil 2: Hybridisierungssignal bei ca. 2,9kb.

Auch bei weiteren neun Enzym/Sonden Kombinationen (*MboI/acs5.1*, *MboI/acs5.2*, *MvaI/acs5.1*, *MvaI/acs5.2*, *XbaI/acs5.1*, *XbaI/acs5.2*, *Hin6I/acs5.1*, *Hin6I/acs5.2* und *MspI/acs5.1*) konnten keine Polymorphismen detektiert werden.

Auch die Southern-Hybridisierungen mit *CsACS2* homologen Sonden zeigten nach der Restriktion mit 5 Enzymen (*MboI*, *MvaI*, *XbaI*, *Hin6I* und *MspI*) keine Polymorphismen zwischen den gynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanzen.

3.3.4 Expressionsanalysen der Sequenz *CsACS5* in unterschiedlichen Organen andrözischer und gynözischer Pflanzen

Zur Expressionsanalyse der neu isolierten Sequenz *CsACS5* wurde mit RNA aus unterschiedlichen Organen gynözischer und andrözischer Pflanzen eine RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde durch den Einsatz des Primerpaars ACC5 bei einer annealing Temperatur von 56°C ein 293bp Fragment amplifiziert (sense Primer 5`CACAAACGC AGTACCTTCT`3 und antisense Primer 5`ACCTGGTTCGGAGCAATG`3; *CsACS5*-Sequenz siehe Anhang 7.5; Abb. 7.2).

In Abb. 3.13 sind als Beispiel von jeweils einer der insgesamt drei untersuchten gynözischen und andrözischen Pflanzen die Ergebnisse der RT-PCR mit RNA aus der Wurzel, jungen Blättern und Blütenknospen dargestellt. Dabei zeigte sich eine identische Expression in allen untersuchten Organen der gynözischen (*MM AcrAcr*) und phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Pflanzen des genetischen Hintergrundes WrD, so dass keine Korrelation zwischen der Expression des Gens *CsACS5* und dem *Acr/acr* Gen nachgewiesen werden konnte.

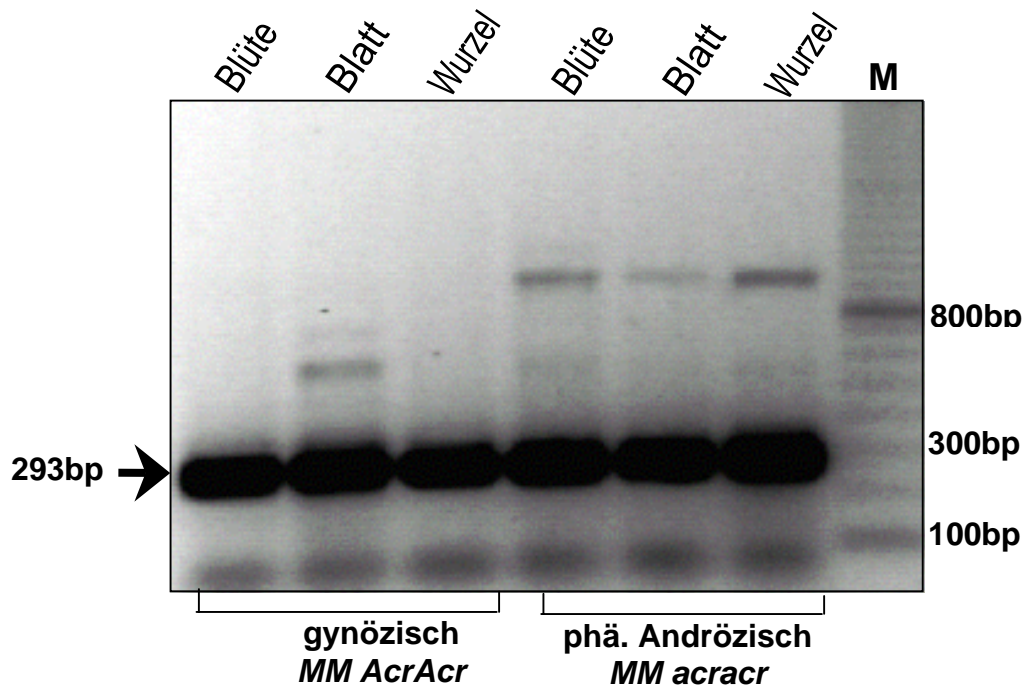


Abb. 3.13: Expressionsanalyse des Gens *CsACS5* mittels RT-PCR bei Blüten, Blättern und Wurzeln einer gynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanze aus dem genetischen Hintergrund WrD
Pfeil: Amplifikation des erwarteten Fragments mit der Größe von 293bp.

3.3.5 Molekulargenetische Charakterisierung und Isolierung unbekannter Sequenzbereiche des *CsACS1*- Gens

3.3.5.1 Einsatz verschiedener Enzym/Sonden-Kombinationen zur Charakterisierung des *CsACS1* Gens

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse von TREBITSH et al. (1997) und KAMATISHI et al. (2000) ist davon auszugehen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem *Acr* Locus und dem Gen *CsACS1* besteht. Aus diesem Grund wurden mit den Primerpaaren ACS1.3 und ACS1.4 DNA-Fragmente des *CsACS1* Gens amplifiziert und als Sonden, *acs1.3* und *acs1.4* bei Hybridisierungsanalysen von gynözischen (*MM AcrAcr*) subgynözischen (*MM AcrAcr*) und phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Pflanzen eingesetzt.

Von den insgesamt 36 getesteten Enzym/Sonden-Kombinationen zeigten drei (*Hin6I/acs1.3*, *MvaI/acs1.3* und *MboI/acs1.3*) ein zusätzliches Hybridisierungssignal bei den gynözischen und subgynözischen Pflanzen der genetischen Hintergründe WrD und ED, welches bei den phänotypisch andrözischen fehlt (siehe Abb. 3.14, Pfeil 1, 2 und 3).

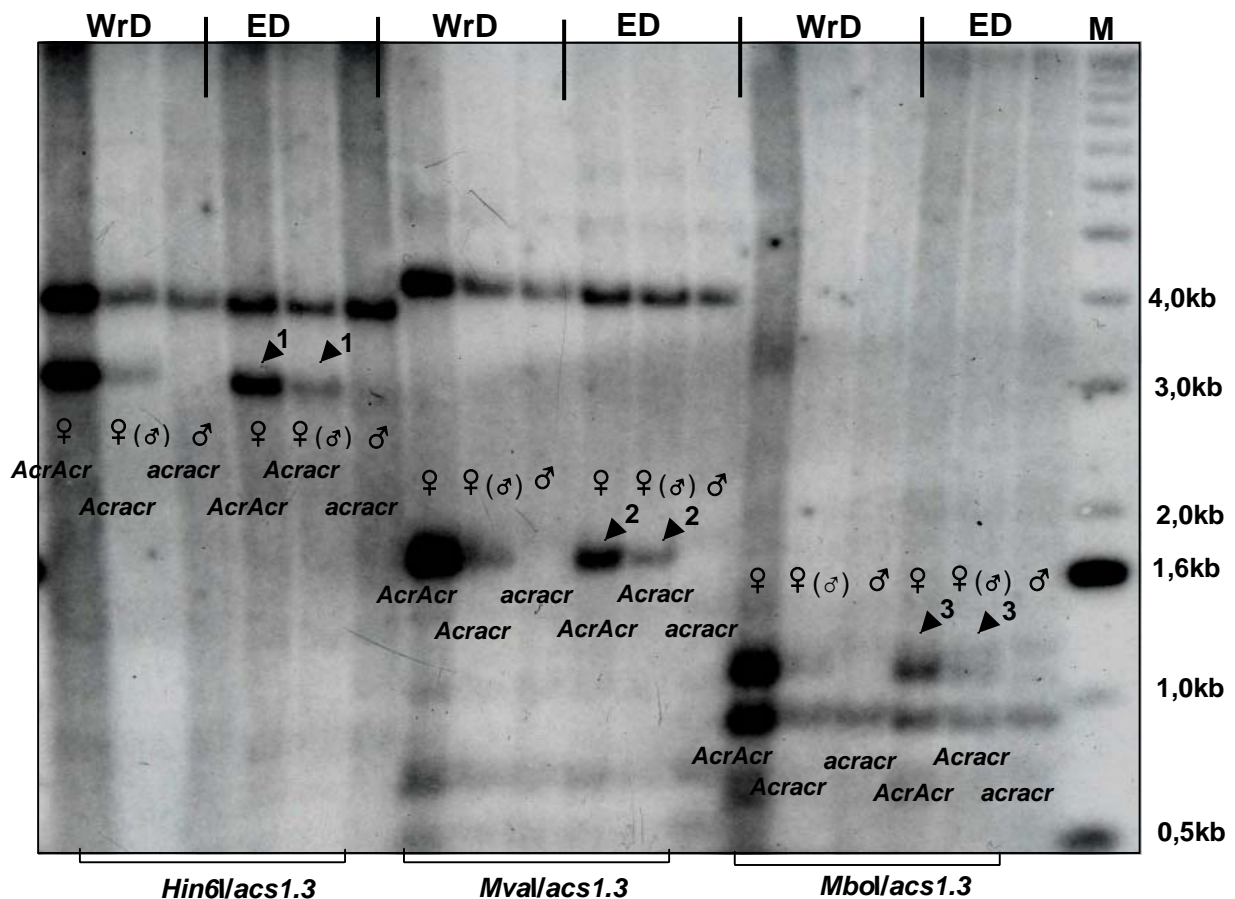


Abb. 3.14: Hybridisierungsmuster der gynözischen, subgynözischen und andrözischen Linien der genetischen Hintergründe WrD und ED mit der Sonde *acs1.3* (siehe auch Abb. 3.16 A)
 Pfeil 1 : zusätzliches Fragment der gynözischen (*AcrAcr MM*) und subgynözischen (*AcrAcr MM*) Pflanzen bei ca. 3,0kb am Beispiel des genetischen Hintergrundes ED
 Pfeil 2 : zusätzliches Fragment der gynözischen (*AcrAcr MM*) und subgynözischen (*AcrAcr MM*) Pflanzen bei ca. 1,7kb am Beispiel des genetischen Hintergrundes ED
 Pfeil 3 : zusätzliches Fragment der gynözischen (*AcrAcr MM*) und subgynözischen (*AcrAcr MM*) Pflanzen bei ca. 1,2kb am Beispiel des genetischen Hintergrundes ED.

Zusätzlich konnte ein Unterschied der Hybridisierungsintensität dieser polymorphen Banden zwischen den gynözischen (*AcrAcr MM*) und subgynözischen (*Acracr MM*) Pflanzen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.14, Pfeil 1, 2 und 3). Damit gelang es erstmals mittels quantitativ kodominanter RFLP-Marker die am *Acr/acr*-Locus heterozygoten subgynözischen von den dominant homozygot gynözischen Pflanzen zu unterscheiden.

3.3.5.2 Hybridisierung mit verschiedenen Sequenzabschnitten des Gens *CsACS1* zur Entwicklung einer Restriktionskarte

Zur Analyse der polymorphen Hybridisierungsmuster, die eine Kopplung mit dem dominanten *Acr*-Allel zeigten (siehe TREBITSH et al. 1997 bzw. Abb. 3.9 in Kapitel 3.3.1.2 und Abb. 3.14 in Kapitel 3.3.5.1), erfolgten Hybridisierungsstudien mit Sonden, die eine Homologie zu verschiedenen Sequenzbereichen des Gens *CsACS1* aufwiesen.

In Abb. 3.15, A wird das Gen *CsACS1* mit den drei verwendeten Sonden und den *MspI* Schnittstellen schematisch dargestellt. Die unterschiedlichen Hybridisierungsmuster der mit *MspI* restringierten genomischer DNA der gynözischen und andrözischen Pflanzen sind in Abb. 3.15; B (*acs1.1*), C (*acs1.1.1*) und D (*acs1.1.2*) dargestellt.

Erfolgte eine Hybridisierung mit der Sonde *acs1.1* (siehe Abb. 3.15 A) wurde das bereits von TREBITSH et al. (1997) beschriebene Hybridisierungsmuster mit einer 2,5kb, einer 0,9kb und der polymorphen 3,4kb Hybridisierungsbande bei den gynözischen und subgynözischen Genotypen bestätigt (siehe Abb. 3.15; B).

Die Sonde *acs1.1.1* (siehe Abb. 3.15A) detektiert nur das Hybridisierungsfragment von 2,5kb (bei allen Geschlechtstypen) und ein polymorphes 3,4kb Fragment (bei gynözischen Geschlechtstypen). Jedoch konnte 0,9kb Hybridisierungsbande nicht detektiert werden (vgl. Abb. 3.15; B und C).

Bei der Verwendung der Sonde *acs1.2.2*, die das 3'Ende des Gens *CsACS1* repräsentiert (siehe Abb. 3.15A), konnten keine Hybridisierungsfragmente bei 2,5kb und bei 3,4kb nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.15 B und D). So zeigte sich unabhängig vom Geschlechtstyp bei der Hybridisierung mit der Sonde *acs1.1.2* nur die 0,9kb Hybridisierungsbande (Abb. 3.15 D). Damit gelang es nicht, bei Verwendung der Sonde *acs1.1.2* den mit dem dominanten *Acr*-Allel gekoppelten Polymorphismus nachzuweisen.

Die unterschiedlichen Hybridisierungsmuster, die in Abhängigkeit von den unterschiedlichen *CsACS1* homologen Sonden nachgewiesen wurden, deuten darauf hin, dass der mit dem *Acr*-Gen gekoppelte Polymorphismus (Abb. 3.14 in Kapitel 3.3.5.1) durch einen Sequenzunterschied am 5'Ende des dominanten *Acr*-Allels im Vergleich zum Gen *CsACS1* entsteht.

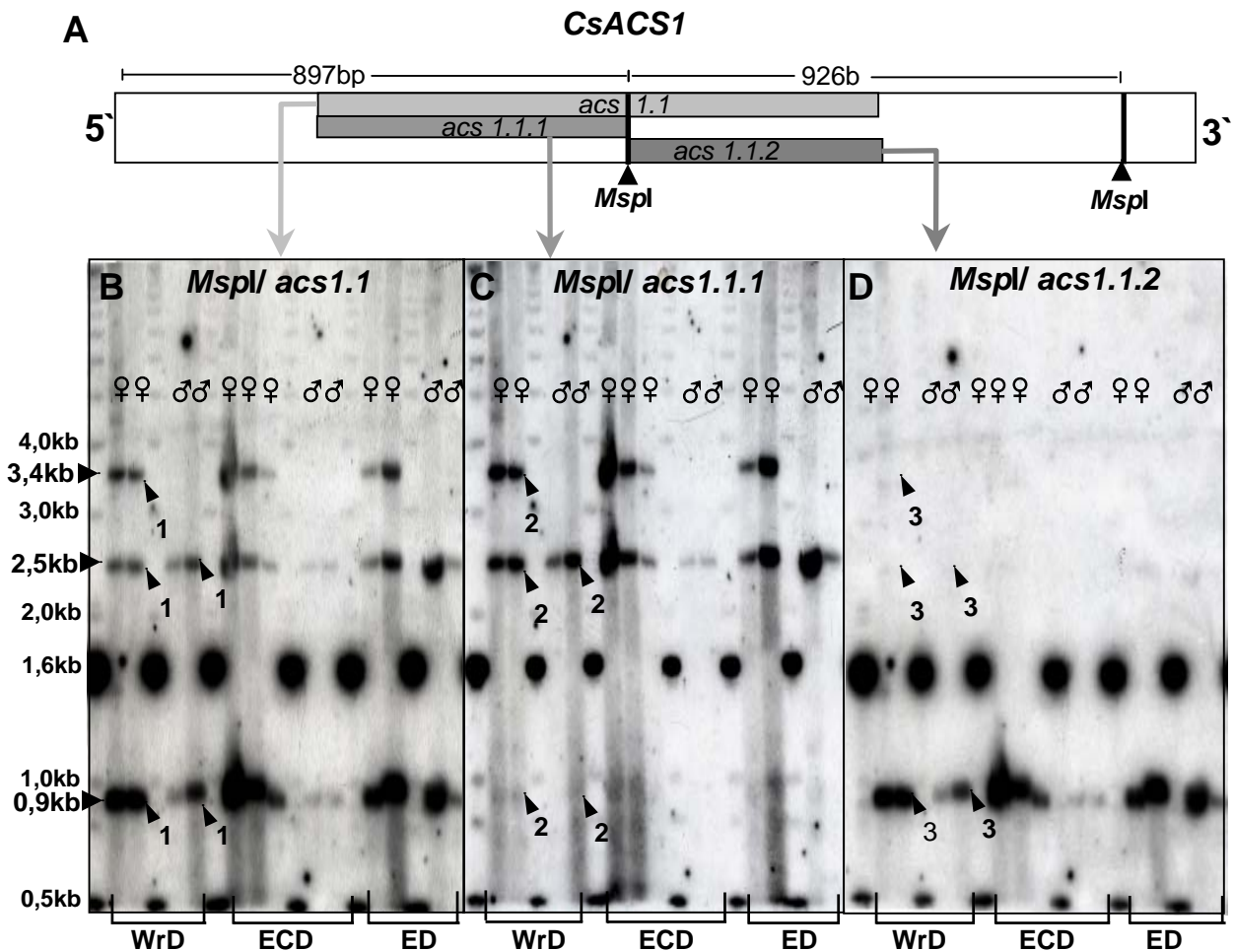


Abb. 3.15: Schematische Darstellung des Gens *CsACS1* mit der Position der Sonden *acs1.1*, *acs1.1.1* und *acs1.1.2* und der *MspI* Schnittstellen (A).

Darstellung unterschiedlicher Hybridisierungsmuster bei *MspI* restringierten gynözischen und andrözischen Pflanzen der genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD mit den Sonden *acs1.1* (B), *acs1.1.1* (C) und *acs1.1.2* (D).

Pfeil 1: Hybridisierungsmuster von gynözischen (3,4 kb, 2,5 kb, 0,9 kb) und phänotypisch andrözischen Pflanzen (2,5 kb, 0,9 kb) am Beispiel des genetischen Hintergrundes WrD

Pfeil 2: Hybridisierungsmuster von gynözischen (3,4 kb, 2,5 kb) und phänotypisch andrözischen (2,5 kb) Pflanzen am Beispiel des genetischen Hintergrundes WrD

Pfeil 3: Hybridisierungsmuster von gynözischen (0,9 kb) und phänotypisch andrözischen (0,9 kb) Pflanzen am Beispiel des genetischen Hintergrundes WrD.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen und eine vergleichende Restriktionskarte des Gens *CsACS1* bzw. der Sequenz, die zur Entstehung des Polymorphismus führt, zu entwickeln, wurden weitere Hybridisierungsstudien mit unterschiedlichen *CsACS1* homologen Sonden durchgeführt.

Als zusätzlicher Beweis, dass der gesuchte Sequenzunterschied im 5'-Bereich besteht, ist in Abb. 3.16 ein weiteres Beispiel eines unterschiedlichen Hybridisierungsmusters (Restriktion mit *MboI*) dargestellt. Dieses zeigt, dass der Polymorphismus nur mit der Sonde *acs1.3* die 5' Ende des Gens *CsACS1* darstellt (siehe Abb. 3.16A), nachzuweisen ist (Abb. 3.16; B; Pfeil2).

Beim Einsatz der Sonde *acs1.4*, die das 3' Ende des Gens *CsACS1* repräsentiert (Abb. 3.16A), konnte der mit dem dominanten *Acr*-Allel gekoppelte Polymorphismus (zusätzliche Bande bei

gynözischen (*MM AcrAcr*) und subgynözischen (*MM Acracr*) Genotypen) nicht nachgewiesen werden, da lediglich eine Hybridisierungsbande bei ca. 650bp detektiert wurde (vgl. A und B in Abb. 3.10; Pfeil1).

Damit wurde sowohl bei den in Abb. 3.15 und 3.16 dargestellten Hybridisierungen als auch bei allen weiteren Hybridisierungen (Ergebnisse nicht dargestellt), der mit dem dominanten *Acr* Locus gekoppelte Polymorphismus nur mit zum 5'-Ende des Gens *CsACSI* homologen Sonden (z.B. *acs1.1.1* und *acs1.3*) nachgewiesen.

Mit allen *CsACSI* homologen Sonden wurde jedoch auch immer eine Hybridisierungsbande unabhängig vom Geschlechtstyp detektiert (siehe Abb. 3.15 und 3.16). Diese geschlechtstunabhängige Hybridisierungsbande deutet darauf hin, dass das Gen *CsACSI* bei allen Geschlechtstypen existiert.

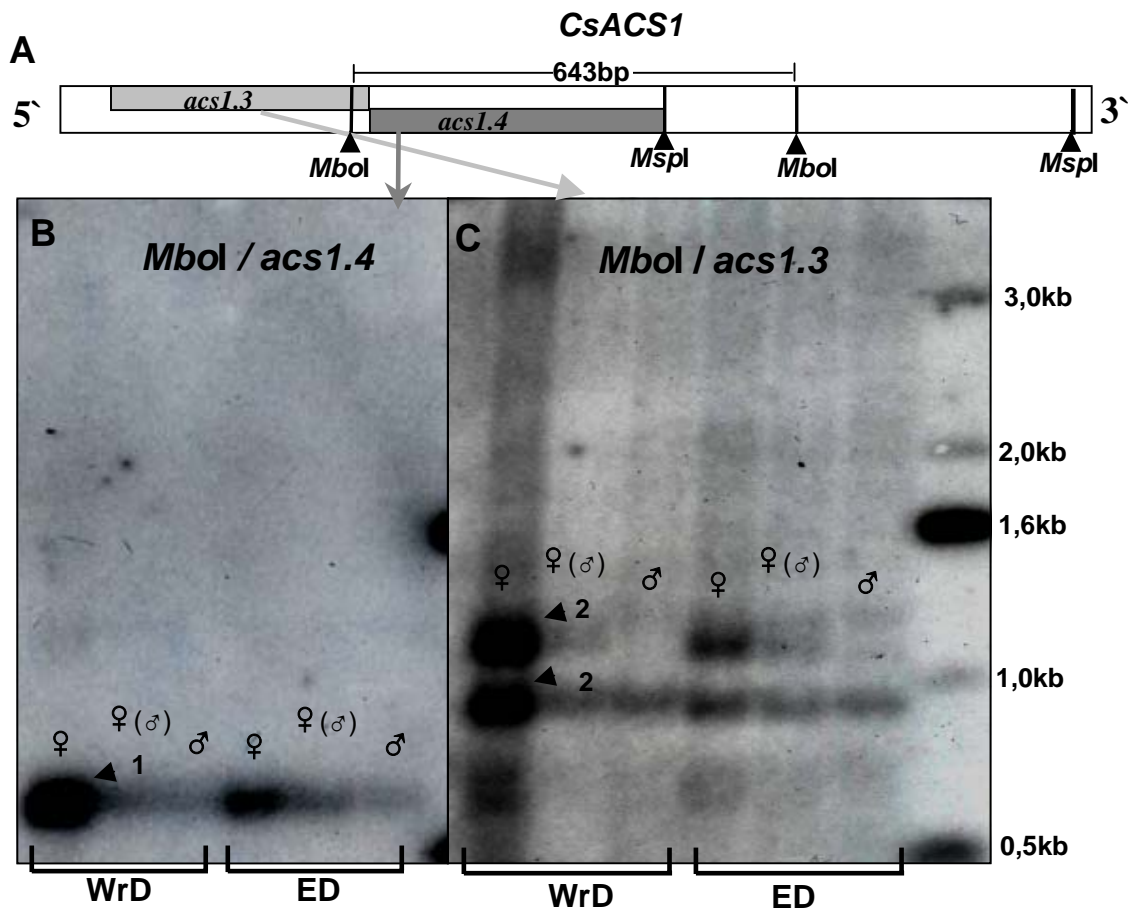


Abb. 3.16: Darstellung unterschiedlicher Hybridisierungsmuster bei *MboI* restringierten gynözischen, subgynözischen und andrözischen Pflanzen des genetischen Hintergründe WrD und ED mit den Sonden *acs1.3*(B) und *acs1.4* (C) aus dem Gens *CsACSI* (A).

Pfeil 1: Hybridisierungsbande bei ca. 650bp; als Beispiel ♀ aus WrD

Pfeil 2: Hybridisierungsbanden bei ca. 900bp und ca. 1100bp; als Beispiel ♀ aus WrD.

Folglich muss davon ausgegangen werden, dass ein zweites geschlechtsbeeinflussendes zu *CsACSI* homologes Gen bei gynözischen und subgynözischen Pflanzen vorhanden ist. Die Existenz dieses mit dem dominanten *Acr*-Allel gekoppelten Gens wurde bereits von TREBITSH et al. (1997) postuliert und zunächst als *CsACSIG* Sequenz bezeichnet (siehe Kapitel 3.1.2).

Aufgrund der Southern-Hybridisierungen ist zu vermuten, dass der mit den *Acr*-Allel gekoppelte Polymorphismus durch Sequenzunterschiede am 5`Ende zwischen dem Gen *CsACSI* und der *CsACSIG* Sequenz bedingt wird.

Mit Hilfe der in Abb. 3.7 in Kapitel 3.2.6.3 dargestellten Sequenz des Gens *CsACSI* bzw. den daraus abgeleiteten Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsendonukleasen (*MspI*, *Hin6I*, *MboI* und *MvaI*) und den Hybridisierungsmustern nach Einsatz unterschiedlicher Sonden aus dem Gen *CsACSI* (siehe Abb. 3.15 und Abb. 3.16), konnte die in Abb. 3.17 dargestellte Restriktionskarte für das Gen *CsACSI* und die *CsACSIG* Sequenz entwickelt werden. Diese Restriktionskarte wurde bei anschließenden Arbeiten zur Isolierung des 5`-Bereichs des Gens *CsACSI* und der *CsACSIG* Sequenz genutzt (siehe Kapitel 3.3.5.3).

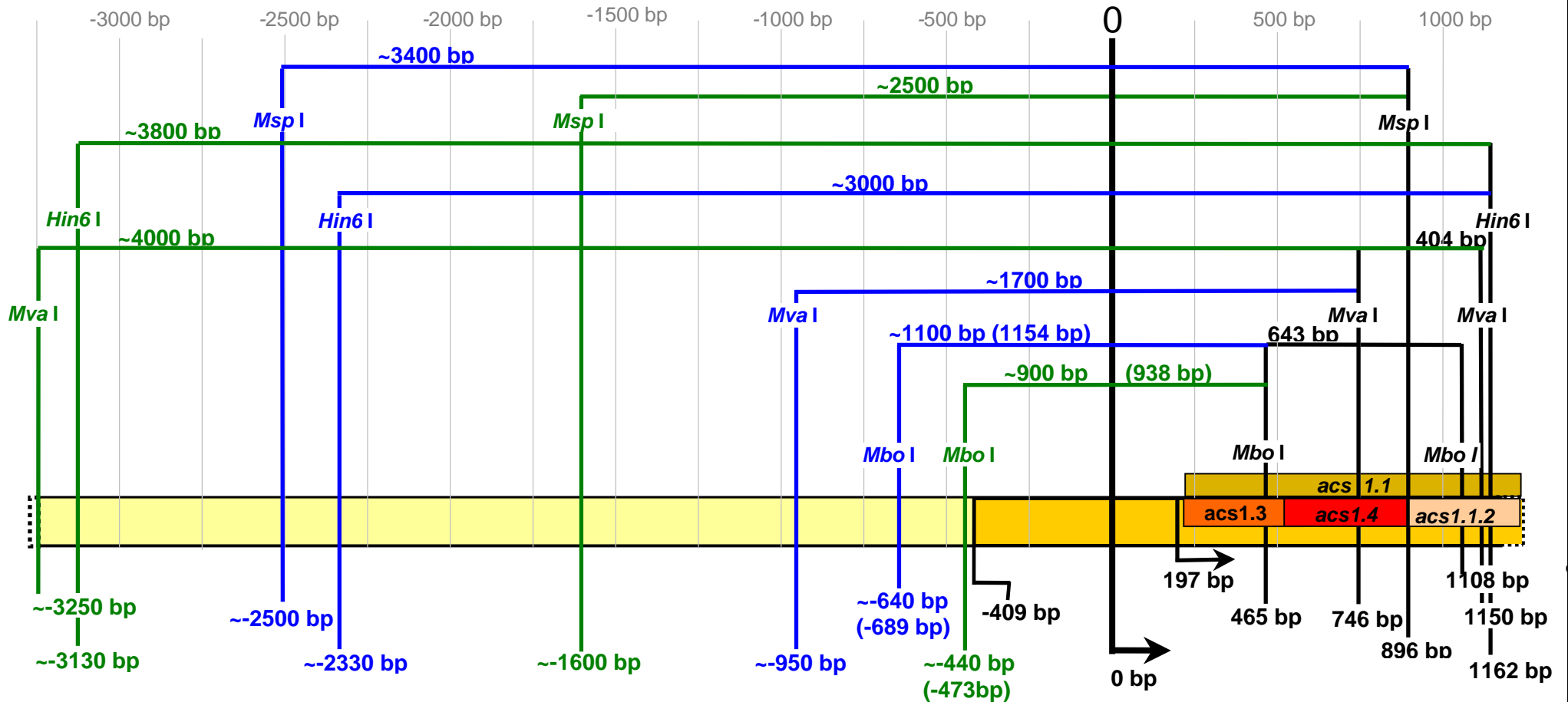


Abb. 3. 17 : Restriktionskarte des 5'-Bereiches des Gens *CsACSI*- bzw. der *CsACSIG* Sequenz die in blau (z.B. *MspI* ~2500bp) dargestellten Restriktionsenzymchnittstellen und Abstände in bp stellen die Sequenz *CsACSIG* dar, die in grün dargestellten Schnittstellen (z.B. *MspI* ~1600bp) stellen das Gen *CsACSI* dar und die gemeinsame Restriktionsschnittstellen sind in schwarz dargestellt

□ = vermuteter heterologer Sequenzbereich des Gens *CsACSI* und der *CsACSIG* Sequenz

□ = homologer Sequenzbereich des Gens *CsACSI* und der *CsACSIG* Sequenz

0 = Transkriptionsstart des Gens *CsACSI* (nach 197bp beginnt die Translation) (siehe auch Abb. 3.7 in Kapitel 3.2.6.3); - = vom Transkriptionsstart zum 5' Ende in bp;

~ = Aufgrund der Hybridisierungsmuster geschätzte Entfernung der Restriktionsenzymchnittstelle vom Transkriptionsstart; () = bereits bekannte

Restriktionsschnittstellenabstände innerhalb des heterologen Sequenzbereichs; □ = Sonde *acs1.1*; □ = Sonde *acs1.3*; □ = Sonde *acs1.4*; □ = Sonde *acs1.1.2*.

Die Sequenzen der isolierten Fragmente zeigen neben dem bekannten 5'-Ende des *CsACSI* Gens (siehe Ausgangssequenz des *CsACSI* Gens Abb. 3.7 in Kapitel 3.2.6.3) einen weiteren vollständig homologen Sequenzabschnitt von 409bp (siehe Abb. 3.18). In diesem Bereich konnten die konservativen cis-Elemente des Promotors die TATA-Box und die CAAT-Box nachgewiesen werden (weiteres siehe Diskussion Kapitel 3.4.4 und BUCHANAN et al. 2000). Neben diesen grundlegenden cis-Elementen eines eukaryontischen Promotors konnte außerdem ein Auxin-induzierbares cis Element (GUILFOYLE und HAGNEN 2001) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.18).

An den homologen 5'-Sequenzbereich des Gens *CsACSI* und der *CsACSIG* Sequenz schließt sich jedoch ein heterologer Sequenzbereich an, der dazu führt, dass unterschiedliche *MboI* Schnittstellen der beiden Fragmente entstehen (siehe Abb. 3.18). Der daraus resultierende Größenunterschied von 216bp konnte bereits durch Southern-Hybridisierungen mit dem dominanten *Acr*-Allel korreliert werden (siehe Abb. 3.16 in Kapitel 3.3.5.2), und mit Hilfe der Restriktionskarte auf ca. 200bp geschätzt werden (siehe Abb. 3.17).

Folglich ist davon auszugehen, dass das isolierte 727bp Fragment das 5'Ende des Gens *CsACSI* darstellt und dass mit dem Fragment der Größe 943bp der 5'Bereich der *CsACSIG* Sequenz isoliert wurde.

Zur weiteren Bestätigung der in diesem Kapitel vorgestellten Amplifikation der 5'-Bereiche des Gens *CsACSI* und der Sequenz *CsACSIG* wurden Primer aus homologen Bereichen und aus heterologen Sequenzbereichen abgeleitet und bei gynözischen (*MM AcrAcr*), subgynözischen (*MM Acracr*) und phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) der drei genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD getestet.

Zunächst erfolgte eine Amplifikation mit einem sense Primer (*CsACSI/5'1s*) aus dem heterologen 5'-Ende der Sequenz *CsACSIG* und einem antisense Primer (*CsACSI/5'1as*) aus dem homologen Sequenzbereich des Gens *CsACSI* und der *CsACSIG* Sequenz (siehe grau markierte Bereiche der Abb. 3.18).

Die in Abb. 3.19A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass lediglich bei den Genotypen mit einem dominanten *Acr*-Allel (gynözisch und subgynözisch) eine Amplifikation der Sequenz *CsACSIG* (430bp) erfolgt.

Zur gleichzeitigen Amplifikation des Gens *CsACSI* und der *CsACSIG* Sequenz wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen sense und antisense Primern (*CsACSI/5'1*) ein zweiter sense Primer (*CsACSI/5'2s*) aus dem homologen Bereich des Gens *CsACSI* und der Sequenz *CSACSIG* abgeleitet (siehe grau markierte Bereiche der Abb. 3.18) und eingesetzt.

Das Ergebnis dieser Duplex-PCR zeigt (siehe Abb. 3.19B), dass bei allen Genotypen, unabhängig vom Geschlechtstyp, das erwartete Fragment von 287bp des Gens *CsACSI* amplifiziert wurde. Bei den Genotypen mit einem dominanten *Acr*-Allel erfolgte die erwartete zusätzliche Amplifikation der Sequenz *CsACSIG* von 430bp.

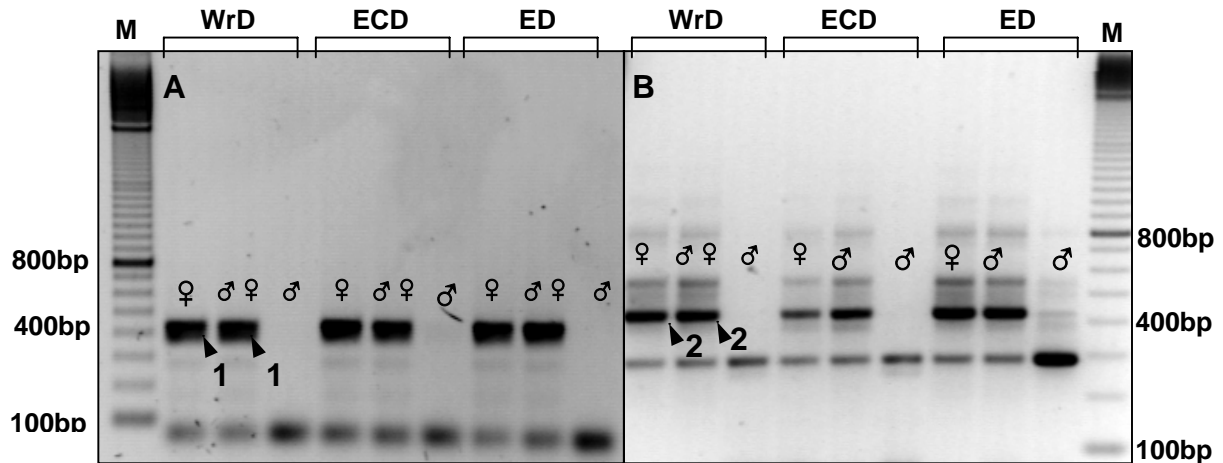


Abb. 3.19: (A): Darstellung der spezifischen Amplifikation der Sequenz *CsACSI* (430bp) bei gynodioecischen und subgynodioecischen Pflanzen der genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD
Pfeil 1: Beispiel der zusätzlichen Amplifikation bei gynodioecischen und subgynodioecischen Pflanzen des genetischen Hintergrundes WrD.
(B): Darstellung der gleichzeitigen Amplifikation der Sequenz *CsACSI* (430bp) und des Gens *CsACSI1* (278bp) mittels Duplex-PCR bei gynodioecischen, subgynodioecischen und androdioecischen Pflanzen der genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD.
Pfeil: Beispiel für gynodioecische und subgynodioecische Pflanzen des genetischen Hintergrundes WrD.

Weiterhin erfolgte mit dem neu entwickelten Primerpaar (*CsACSI1/5'1*) eine Analyse der in Tab. 3.10; Kapitel 3.3.1.2 vorgestellten 11 Nachkommenschaften aus den genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD (Ergebnisse nicht dargestellt).

Diese Analysen zeigten bei den 32 gynodioecischen und 40 monodioecischen Pflanzen die Amplifikation des 430bp Fragmentes (*CsACSI*). Dagegen wurde bei keiner der untersuchten 15 androdioecischen Pflanzen eine Amplifikation des 430bp Fragmentes nachgewiesen. Damit gelang es, die Ergebnisse der Testkreuzungen (Kapitel 3.3.1.1) und der RFLP-Analysen (Kapitel 3.3.1.2) mittels des neu entwickelten PCR Markers zu bestätigen.

3.4 Diskussion

3.4.1 Die methodischen Ansätze

Die Charakterisierung des *Acr/acr*-Gens des verwendeten Pflanzenmaterials erfolgte zunächst mit der Bonitur des Ausgangsmaterials und anschließenden Kreuzungsanalysen.

Mit Hilfe einer Kreuzungsanalyse können direkte Wechselwirkungen und Ausprägungen des zu charakterisierenden Gens beobachtet werden, so dass notwendige Erkenntnisse für weitere Arbeiten (z. B. der Hinweis auf eine multiple Allelie) erhalten werden können. So gelang es bei der vorliegenden Arbeit nur mittels klassisch genetischer Analysen, Informationen über die Einflüsse des genetischen Hintergrundes zu gewinnen.

Da die untersuchte Ausprägung des *Acr/acr* Gens jedoch zum Teil von Umweltfaktoren und dem genetischen Hintergrund abhängig ist (z. B. determinierter Wuchs, siehe auch Kapitel 3.2.1), konnten nicht alle Fragestellungen zur Charakterisierung des *Acr/acr*-Locus mittels Testkreuzungen aufgeklärt werden. So war zu vermuten, dass unterschiedliche Genotypen einen identischen Phänotyp ausprägen können, so dass damit eine korrekte Auswertung der Spaltungsanalysen erschwert wurde (weiteres siehe Kapitel 3.4.2).

Aus diesem Grund erfolgte für eine zusätzliche Charakterisierung der Ausgangslinien der Einsatz des von TREBITSH et al. (1997) entwickelten RFLP-Markers. Da mit Hilfe dieses dominant/rezessiven RFLP-Markers jedoch lediglich Genotypen mit einem dominanten *Acr*-Allel nachzuweisen sind, können auch mit dieser molekulargenetischen Methode nicht alle Fragen aufgeklärt werden (weiteres siehe Kapitel 3.4.2).

Erst eine Kombination der klassisch genetischen (Testkreuzungen) und der molekulargenetischen Analysen (RFLP) ermöglichte bei der vorliegenden Arbeit eine genauere Charakterisierung des verwendeten Ausgangsmaterials bezüglich des *Acr/acr*-Gens (siehe Kapitel 3.4.2).

Weitere Southern-Hybridisierungen konnten in den anschließenden Untersuchungen dazu genutzt werden, den *Acr/acr*-Locus molekulargenetisch näher zu charakterisieren. Damit wurde eine seit vielen Jahren verwendete Methode (Southern-Hybridisierung) bei der vorliegenden Arbeit sehr effizient zur Analyse eines Gens eingesetzt.

Die anschließend verwendete Methode der Splinkerette PCR (DEVON et al. 1995) zur Amplifikation unbekannter flankierender Bereiche von bekannten Sequenzen hat den großen Vorteil, dass aufwendige Schritte, wie das Klonieren und Durchmustern von genomischen Banken nach dem Zielgen, entfallen. Die Reichweite dieser PCR-Methode ist jedoch nicht unbegrenzt, so dass sehr lange DNA-Fragmente möglicherweise nicht amplifiziert werden.

Da jedoch bei der vorliegenden Arbeit eine genaue Abschätzung der zu amplifizierenden Größen durch die Konstruktion der Restriktionskarte ermöglicht wurde, konnte die Splinkerette-PCR-Methode gezielt und damit ohne Einschränkungen eingesetzt werden.

3.4.2 Charakterisierung des *Acr/acr*- Gens in dem verwendeten Pflanzenmaterial durch die Kombination klassisch genetischer Kreuzungsanalysen und molekulargenetischer Methoden

Mittels Kreuzungs- und RFLP-Analysen wurde der Nachweis erbracht, dass alle monözisch bonitierten und zu Testkreuzungen eingesetzten Pflanzen am *Acr/acr*-Locus heterozygot waren. Damit wurden bei den in Kapitel 3.2.1; Abb. 3.2 dargestellten Rückkreuzungsprogramm wahrscheinlich keine genotypisch monözischen (*acracr M. A.*) Pflanzen verwendet, sondern subgynözische (*Acracr MM ..*) Pflanzen. Auch bei Untersuchungen von SHIFFRIS et al. (1964) konnten am *Acr/acr*-Locus heterozygote monözische Geschlechtstypen nachgewiesen werden.

Aufgrund der Verwendung der phänotypisch monözisch bonitierten, aber genotypisch subgynözischen Pflanzen beim Rückkreuzungsprogramm entstanden in der F₁-Nachkommenschaft gynözische (*MM AcrAcr*) und subgynözische (*MM Acracr*) Genotypen in einem Verhältnis von 1:1 (gynözisch : subgynözisch). Da stets die Hälfte der F₁-Nachkommenschaft zur Induktion von männlichen Blüten mit AgNO₃ behandelt wurden (siehe Rückkreuzungsprogramm Abb. 3.2), konnten jedoch die gynözischen von den subgynözischen Pflanzen nicht unterschieden werden. Damit entstanden durch Kreuzungen oder Selbstungen von AgNO₃-behandelten genotypisch gynözischen (*MM AcrAcr*) Pflanzen zum Teil rein gynözische F₂-Nachkommenschaften. Da diese Nachkommenschaften nicht für eine erneute Rückkreuzung genutzt werden konnten, musste auf eine aufspaltende F₂-Nachkommenschaft der Vorjahre zurückgegriffen werden. Daher erfolgten, im Gegensatz zu den 9 Rückkreuzungen der hermaphroditischen Linien, lediglich 6 Rückkreuzungen. Da die ersten Rückkreuzungen bezüglich der Isogenität jedoch den größten Anteil haben, konnte auch bei den monözischen Linien ein Isogenitätsgrad von über 98% zu den gynözischen Linien erreicht werden.

Bei allen untersuchten monözisch blühenden Pflanzen der drei genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD wurde Heterozygotie am *Acr*-Locus nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass in den untersuchten Nachkommenschaften höchstwahrscheinlich keine monözischen Pflanzen vorkommen, die tatsächlich genotypisch monözisch (*MM acracr A.*) sind. Damit konnte die in Kapitel 3.2.1 erwähnte Vermutung, dass aufgrund von Umweltfaktoren und dem genetischen Hintergrund keine phänotypische Unterscheidung zwischen den monözischen (*MM acracr A.*) und den subgynözischen (*MM Acracr ..*) Pflanzen möglich ist, für das verwendete Pflanzenmaterial nicht bestätigt werden.

Weiterhin wurde eine unerwartet hohe Anzahl von andrözischen Pflanzen gefunden. Dieses Ergebnis kann durch zwei verschiedene Ursachen erklärt werden. Zum einen könnte vermutet werden, dass in den Linien während des Zuchtprogramms das dominante A-Allel ausgekreuzt wurde, so dass nur noch andrözische Pflanzen in den Aufspaltungen zu beobachten sind.

Folglich würde eine genotypisch monözische Geschlechtsausprägung (*acracr M. A.*) in dem untersuchten Pflanzenmaterial nicht mehr auftreten.

Der unerwartet hohe Anteil andrözischer Pflanzen könnte jedoch auch durch den determinierten Wuchs des Pflanzenmaterials entstehen, so dass die monözischen Genotypen aufgrund ihres determinierten Wachses nicht die weibliche Phase erreichen und folglich phänotypisch als andrözisch erscheinen (siehe auch Kapitel 2.4.1; SHIFRISS et al. 1964; GÖNEN 1975 und FRANKEN 1979).

Einen Hinweis auf geschlechtsbeeinflussende Faktoren, die zum einen durch den determinierten Wuchs und zum anderen durch die Epistasie des *Acr/acr* Gens im untersuchten Pflanzenmaterial nicht zur Ausprägung kommen, zeigten einige Nachkommenschaften der Kreuzungen zwischen definiert gynözischen und andrözischen Pflanzen. So kam es bei einigen Nachkommenschaften trotz eines identischen heterozygoten *Acr/acr* Locus zu einer signifikanten 1:3 (gynözisch:subgynözisch (monözischer Phänotyp)) Aufspaltung (siehe z. B. Kreuzungen D in Tab. 3.9). Einige Kreuzungen zwischen definiert gynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanzen zeigten jedoch rein subgynözische Nachkommenschaften. Da alle Nachkommenschaften bei kontrollierten Umweltbedingungen kultiviert wurden, muss davon ausgegangen werden, dass in einigen Nachkommenschaften weitere Faktoren zu einer Aufspaltung von gynözischen und subgynözischen Geschlechtstypen führen.

Zunächst kann vermutet werden, dass der heterozygote *Acr/acr*-Locus dieser Nachkommenschaften zu einer Vorverlegung der weiblichen Blütenphase führt (SHIFRISS 1961; SHIFRISS und GEORGE 1964; GALUN 1961 und 1974; KUBICKI 1969b). Folglich könnte die sonst durch den determinierten Wuchs nicht zu beobachtende Wirkung des *A/a* Gens (s.o.) bei diesen Nachkommenschaften zu beobachten sein. Auch Untersuchungen von KUBICKI (1969d) zeigten, dass die Epistasie des *Acr/acr*-Locus über den *A/a*-Locus nur dann vollständig ist, wenn auch die Dominanz des *Acr/acr* Locus vollständig ist. Damit könnte auch ein Einfluss des *A/a* Locus bei heterozygoten und unvollständig dominanten *Acr/acr* Locus angenommen werden.

Das *A/a* Gen fördert im repressiven Zustand die Männlichkeit (KUBICKI 1969d), so dass bei den am *Acr/acr* Locus rein heterozygoten Nachkommenschaften durch die Wirkung des spaltenden *A/a* Gens eine Aufspaltung von 3:1 (gynözisch : monözisch) zu erwarten wäre.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch in den entsprechenden Nachkommenschaften eine entgegengesetzte 1:3 (gynözisch:monözische) Aufspaltung, so dass die von KUBICKI (1969d) beschriebene Wirkung des *A/a* Gens bei heterozygoten *Acr/acr* Locus ausgeschlossen werden kann.

Damit könnte die Ausprägung eines weiteren genetischen Faktors innerhalb des verwendeten Pflanzenmaterials vermutet werden. Vergleichbar mit der Ausprägung des *A/a* Gens wäre der

Einfluss dieses vermuteten genetischen Faktors jedoch bei zwei Bedingungen nicht zu beobachten. Zum einen durch die epistatische Wirkung des *Acr/acr* Locus bei genotypisch gynözischen Geschlechtstypen. Zum anderen durch den determinierten Wuchs des Pflanzenmaterials.

Folglich könnte der vermutete genetische Faktor als ein monogen vererbtes Merkmal beschrieben werden, das im rezessiven Zustand die Dominanz des *Acr/acr* Gens und damit die Weiblichkeit fördern würde. Bis heute wurde bei der Gurke lediglich ein Gen beschrieben, das im rezessiven Zustand zu einer Förderung der Weiblichkeit führt. Dieses von KUBICKI (1980) als *Gy/gy* Gen (für gynözisch) bezeichnete Gen wird jedoch unabhängig vom *Acr/acr*-Locus ausgeprägt und führt damit auch bei einem rezessiven *Acr/acr* Locus zu einem gynözischen Geschlechtstyp. Da bei der Charakterisierung des verwendeten Pflanzenmaterials keine gynözischen Pflanzen mit einem rezessiven *Acr/acr* Locus nachgewiesen wurden, muss davon ausgegangen werden, dass der beobachtete genetische Faktor bis heute nicht beschrieben wurde.

Eine Aufspaltung dieses vermuteten genetischen Faktors erfolgt wahrscheinlich sowohl in den definiert gynözischen als auch in den monözischen Nachkommenschaften. Folglich kommt es wahrscheinlich bereits in den F₁- und F₂-Nachkommenschaften zur Aufspaltung und damit zum Auftreten von am *Acr/acr* Locus heterozygoten gynözischen Pflanzen. Aufgrund der zu kleinen Nachkommenschaften soll auf eine Benennung dieses genetischen Faktors in dieser Arbeit verzichtet werden.

Die Beeinflussung der Weiblichkeit durch den genetischen Hintergrund wurde auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen (SHIFRISS 1961; GALUN 1961; SHIFRISS et al. 1964 und SHIFRISS und GEORGE 1964). Jedoch zeigten sich bei diesen Untersuchungen keine eindeutigen Aufspaltungen, so dass eine polygene Wirkung vermutet wurde. So berichten zum Beispiel SHIFRISS et al. (1964) von einem `stark männlichen` oder `stark weiblichen` genetischen Hintergrund.

Durch die Testkreuzungen konnte der vermutete genetische Faktor zunächst in den genetischen Hintergründen WrD und ED nachgewiesen werden.

Die Ausgangslinien des ECD deuten darauf hin, dass der *Acr/acr* Gen eine fast vollständige Ausprägung der Dominanz zeigt. Da der neu detektierte genetische Faktor direkt oder indirekt zu einer vollständigen Dominanz des *Acr/acr* Gens führt, könnte vermutet werden, dass dieser Faktor auch in dem genetischen Hintergrund ECD wirkt, jedoch rein rezessiv vorliegt und folglich nicht aufspaltet. Gegen diese Annahme sprechen jedoch die Ergebnisse der RFLP-Analysen (siehe Kapitel 3.3.1.2; Tab 3.14). So wurden auch im genetischen Hintergrund ECD subgynözische (*MM Acracr*) Pflanzen mit einem zum Beginn der Arbeit als monözisch definierten Geschlechtstyp (siehe Kapitel 2.1.3) nachgewiesen.

Auch die in Kapitel 2.3.2 vorgestellten Pfropfungsversuche zwischen gynözischen und andrözischen Linien des genetischen Hintergrundes ECD zeigten eine 1:3 (gynözisch:monözisch) Aufspaltung der gepfropften andrözischen Sprossspitzen (weiteres

siehe Kapitel 2.3.2; Abb. 2.12). Folglich scheint auch in diesem genetischen Hintergrund der oben beschriebene genetische Faktor aufzuspalten und den Grad der Weiblichkeit zu beeinflussen.

3.4.3 Analyse bekannter und unbekannter ACC-Synthasen bei der Gurke

In Abhängigkeit vom Ethylen wird bei der Gurke die Intensität der Weiblichkeit reguliert (siehe Kapitel 2.1.6). Damit kann jede erhöhte Expression einer ACC-Synthase zu einer erhöhten Weiblichkeit führen, so dass im Prinzip jede der bis heute gefundenen ACC-Synthasen der Gurke ein potentes geschlechtsbeeinflussendes Gen darstellt.

Jedoch fördern auch alle anderen Gene, die zu einer Erhöhung der Ethylenkonzentration führen (z. B. Auxin-Synthese-Gene) die Weiblichkeit (siehe auch Kapitel 2.1.6). Aufgrund dieser grundlegenden Korrelation der Weiblichkeit mit der Ethylenkonzentration können die unterschiedlichen genetischen Hintergründe erklärt werden, die zum Teil als `stark` männlich bzw. `stark` weiblich bezeichnet wurden (SHIFRISS 1961; GALUN 1961; SHIFRISS et al. 1964 und SHIFRISS und GEORGE 1964). Da in allen bis heute untersuchten Herkünften jedoch mit dem *Acr/acr* Gen der größte Anteil der Weiblichkeit erklärt werden kann, ist die Aufklärung der molekularen Funktion dieses Gens von besonderer Bedeutung.

Mit Hilfe von Homologiestudien zwischen den bekannten vier ACC-Synthase-Genen wurden aus konservierten Sequenzbereichen degenerierte Primer konstruiert. Der Einsatz dieser Primer führte zur Klonierung von zwei weiteren ACC-Synthase-homologen Sequenzen.

Während zwischen der detektierten Sequenz *CsACS6* keine Homologie zu den bekannten ACC-Synthase-Genen der Gurke nachgewiesen werden konnte, zeigte die neu isolierte mRNA-Sequenz die als *CsACS5* bezeichnet wurde, eine hohe Homologie zu dem bekannten Gen *CsACS1*. Weitere Analysen zeigten, dass ein genomischer Sequenzabschnitt der Sequenz *CsACS5* eine hohe Homologie zu einer ACC-Synthase ähnlichen Sequenz bei *Cucumis melo* L. aufweist. Da diese ACC-Synthase-Sequenz jedoch bei *Cucumis melo* unvollständig vorliegt, ist sie vermutlich funktionslos.

Bei der Gurke ist diese Funktionslosigkeit für die Sequenz *CsACS5* jedoch auszuschließen, da *CsACS5* eine vollständige ACC-Synthase-Sequenz darstellt (siehe Kapitel 3.3.2; Abb. 3.11 und Anhang 7.5; Abb. 7.4), und deren Transkripte in allen untersuchten Organen nachgewiesen wurden (Kapitel 3.3.4; Abb. 3.13). Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Sequenz *CsACS5* ein bis heute unbekanntes, aktives Gen darstellt. Die zu dem Gen *CsACS5* homologe ACC-Synthase-Sequenz von *Cucumis melo* hat jedoch vermutlich im Laufe der Evolution seine Funktionalität verloren.

Alle durchgeführten Analysen des Gens *CsACS5* zeigten jedoch keine Korrelation zum *Acr/acr* Locus. Aus diesem Grund hat das Gen *CsACS5* bei der Gurke höchstwahrscheinlich lediglich einen indirekten Einfluss (s.o.) auf die Geschlechtsausprägung.

Die von KAMACHI et al. (2000) durchgeführten Expressionsstudien der Gene *CsACS1* und *CsACS2* bei isogenen gynözischen und monözischen Linien zeigten eine exklusive Expression des Gens *CsACS1* in gynözischen Pflanzen. Dagegen wurde eine Expression des Gens *CsACS2* sowohl in den monözischen als auch in den gynözischen Pflanzen nachgewiesen (KAMACHI et al. 2000).

Die erhöhte Expression des Gens *CsACS2* in gynözischen Linien, die nach KAMACHI et al. (1997) für die Induktion weiblicher Blüten bei gynözischen und monözischen Linien verantwortlich ist, wurde auch bei der Verwendung isogener Linien bestätigt (KAMACHI et al. 2000). Eine direkte Korrelation der erhöhten Expression des Gens *CsACS2* und der Induktion von weiblichen Blüten konnte jedoch bei den isogenen Linien nicht nachgewiesen werden (KAMACHI et al. 2000).

Diese bei den gynözischen Linien nachgewiesene erhöhte Expression des Gens *CsACS2* (KAMACHI et al. 1997) könnte jedoch auch durch die autokatalytischen Regulation der Ethylensynthese erklärt werden. So zeigte sich bei verschiedenen Pflanzenarten, dass eine erhöhte endogene Ethylenproduktion oder eine exogene Ethylenwirkung (z.B. Ethephonapplikation) eine Erhöhung der ACC-Synthase und der ACC-Oxidase Expression zur Folge hat (*Pasiflora*: MITA et al. 2002; Nelke: TENHAVE und WOLTERING 1997; Rose: MÜLLER et al. 2000). Folglich könnte die erhöhte Expression des *CsACS2* Gens in gynözischen Linien auf eine Reaktion der zusätzlichen Expression des Gens *CsACS1* (siehe Kapitel 3.3.4) im frühen Entwicklungsstadium (KAMACHI et al. 2000) zurückzuführen sein.

Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Hybridisierungsstudien mit *CsACS2* homologen Sonde bei verschiedenen Geschlechtstypen zeigten keine Polymorphismen und lassen damit keine Kopplung mit dem *Acr/acr* Gen vermuten (siehe Kapitel 3.3.3).

3.4.4 Analyse des Gens *CsACS1*

Die von KAMACHI et al. (2000) durchgeführten Expressionsstudien zeigten, dass die Transkripte des Gens *CsACS1* nur bei gynözischen (*MM AcrAcr*) und nicht bei monözischen (*MM acracr*) Pflanzen nachzuweisen sind. Aufgrund dieser ausschließlichen Expression des *CsACS1* Gens bei Genotypen mit einem homozygot dominanten *Acr* Locus und der Detektion eines RFLP-Markers für das dominante *Acr*-Allel mit einer *CsACS1* homologen Sonde (TREBITSH et al. 1997) ist die Analyse des Gens *CsACS1* für die molekulargenetische Charakterisierung des *Acr/acr* Gens von besonderer Bedeutung.

Zur Analyse des *CsACS1* Gens erfolgte zunächst die Bestätigung des RFLP Markers von TREBITSH et al. (1997) bei dem in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenmaterial (Genetische Hintergründe: WrD, ED und ECD). So konnten mittels Southern-Hybridisierungen durch den Einsatz von *MspI* und einer *CsACS1* Sequenz als Sonde bei gynözischen (*MM AcrAcr*) und

subgynözischen (*MM Acracr*) Pflanzen das erwartete zusätzliche Hybridisierungssignal von 3,4kb nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.9 in Kapitel 3.3.1.2). Weiterhin wurde bei allen getesteten Geschlechtstypen die von TREBITSH et al. (1997) beschriebenen 0,9kb und 2,5kb Hybridisierungssignale bestätigt.

Auch die Hybridisierungsmuster der in der vorliegenden Arbeit neu entwickelten RFLP-Marker zeigten, unabhängig vom Geschlechtstyp, bei allen Pflanzen ein identisches Hybridisierungssignal (siehe Kapitel 3.3.5.1; Abb.3.14). Folglich kann vermutet werden, dass das Gen *CsACSI* unabhängig vom Geschlechtstyp in allen Genotypen existiert.

Das bei gynözischen (*MM AcrAcr*) und subgynözischen (*MM Acracr*) Genotypen zusätzlich auftretende Hybridisierungssignal (siehe Kapitel 3.3.5.1; Abb.3.14), könnte auf eine Genduplikation zurückzuführen sein, welche die von TREBITSH et al. (1997) postulierte *CsACSIG* Sequenz repräsentiert.

Eine Genduplikation von ACC-Synthase Genen wurde bereits für einige andere Pflanzenarten nachgewiesen (z. B. Kartoffel; DESTEFANO-BELTRAN et al. 1995 Zucchini; HUANG et al. 1991). Vermutlich stellt diese Duplikation von ACC-Synthase Genen einen Mechanismus zur Regulation der Ethylenbiosynthese in der pflanzlichen Evolution dar (zusammengefasst in ALEXANDER und GRIERSON 2002).

Folglich könnte im Laufe der Evolution bei dem ursprünglich monözischen Geschlechtstyp der Gurke (siehe Kapitel 2.1.1) eine Genduplikation des Locus *CsACSI* erfolgt sein (siehe Abb. 3.20A). So entstand wahrscheinlich ein weiterer Locus, der vermutlich zunächst eine vollständige Homologie zum *CsACSI* Gen aufwies. Da bereits TREBITSH et al. (1997) die bei gynözischen Pflanzen zusätzlich vermutete Sequenz als *CsACSIG* bezeichnet haben, soll für den vermuteten zusätzlichen Locus im Folgenden auch der Name *CsACSIG* verwendet werden (siehe Abb. 3.20 A).

Im weiteren Verlauf der Evolution führte wahrscheinlich eine Mutation dieses *CsACSIG* Gens zur Entstehung eines heterozygoten Genotyps und zu einer Expression des mutierten Allels (Abb. 3.20 B, Allel III) (siehe oben; Expressionsanalysen von KAMACHI et al. 2000).

Aufgrund dieser erhöhten Expression des Gens *CsACSIG* bei heterozygoten Genotypen kommt es zu einer erhöhten Ethylenkonzentration (Ethylen synthese siehe Kapitel 3.1.2) und damit zu einer Förderung der Weiblichkeit, so dass ein subgynözischer Geschlechtstyp ausgeprägt wird (siehe Abb. 3.20 B). Ein homozygoter Genotyp mit zwei mutierten Allelen am Locus *CsACSIG* würde dann aufgrund einer noch höheren *CsACSIG* Expression einen gynözischen Geschlechtstyp ausprägen (siehe Abb. 3.20 C).

Da die vermutete Hybridisierungsbande des Gens *CsACSI* und des rezessiven *acr*-Allels bei allen RFLP-Analysen eine identische Größe aufwies, ist zu vermuten, dass das rezessive *acr*-Allel keine Sequenzunterschiede zum *CsACSI* zeigt (siehe Kapitel 3.3.5.1; Abb.3.14). Damit ist anzunehmen, dass die oben postulierte Mutation am *CsACSIG* Locus zur Entstehung des dominante *Acr*-Allels geführt hat.

Das oben bereits beschriebene polymorphe Hybridisierungsmuster bei *MspI* restringierter DNA von gynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanzen nach der Hybridisierung mit *CsACS1* kann mittels der in Abb. 3.20 dargestellten Theorie wie folgt erklärt werden:

Das Gen *CsACS1* und das nach der Genduplikation entstandene rezessive *acr* Allel zeigen sich überlagernde identische Hybridisierungssignale bei 0,9kb und 2,6kb und sind folglich bei allen Geschlechtstypen nachzuweisen. Das polymorphe Hybridisierungssignal mit der Größe von 3,4kb könnte die zum dominanten *Acr* Allel mutierte *CsACS1G* Sequenz sein.

Die Summe der Hybridisierungsbanden (0,9kb und 2,5kb) der am *acr*-Gen homozygot rezessiven Genotypen entspricht exakt der Größe der Hybridisierungsbande von 3,4kb (vermutetes *Acr*-Allel). Folglich wurde bei der Bearbeitung der vorliegenden Arbeit zunächst vermutet, dass der Unterschied zwischen dem dominanten und dem rezessiven *Acr/acr* Allel auf eine veränderte *MspI* Restriktionschnittstelle im transkribierten Bereich des *CsACS1G* Gens zurückzuführen ist (MIBUS 2002). Jedoch konnte diese vermutete *CsACS1* homologe Sequenz (*CsACS1G*) mit einer veränderten *MspI* Schnittstelle bei den gynözischen oder subgynözische Genotypen nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

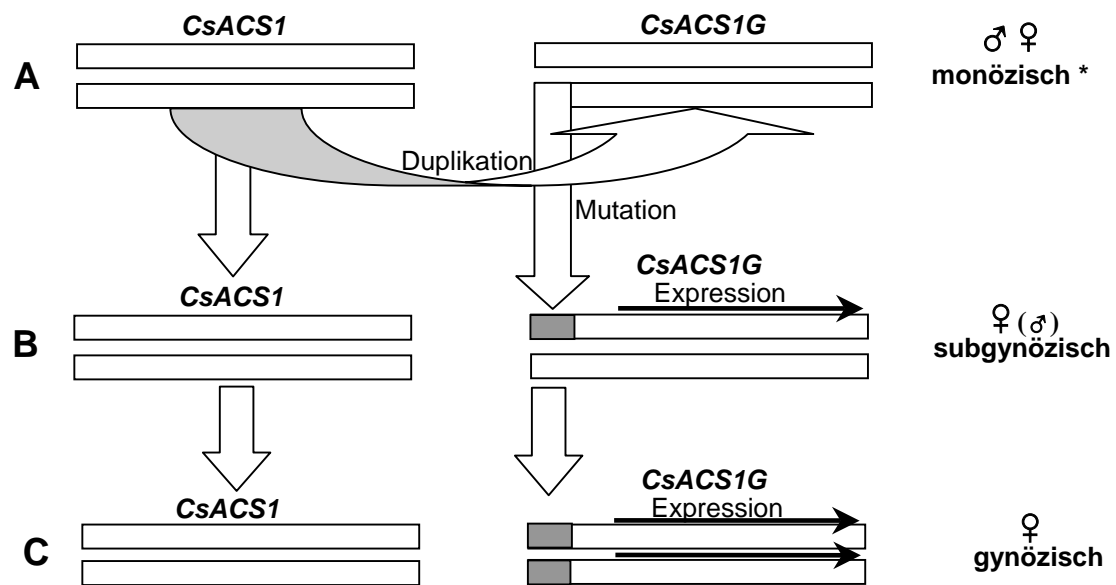


Abb. 3.20 : Darstellung der Entstehung des Locus *CsACS1G* mit resultierenden Veränderungen der Geschlechtsausprägung bei der Gurke.

* = bei dem Pflanzenmaterial dieser Arbeit zeigte der monözische Genotyp eine phänotypisch andrözische Geschlechtsausprägung.

- Genduplikation des Gens *CsACS1* und Entstehung eines zweiten Gens das als *CsACS1G* bezeichnet wird.
- Genmutation = am 5' Ende des Gens *CsACS1G*, die zur Entstehung eines neuen Allels und damit zu einer Expression des Gens führt, so dass eine subgynözische Pflanze entsteht.
- Am *CsACS1G* Locus homozygoter gynözischer Genotyp. Das Gen *CsACS1* bleibt im Hintergrund unverändert erhalten.

Um die Position des von der Mutation betroffenen Sequenzbereiches des in Abb. 3.20 B dargestellten veränderten Allels im Locus *CsACS1G* zu bestimmen, wurden weitere Southern-

Hybridisierungen durchgeführt. Bei diesen Hybridisierungen wurden Sonden verwendet, die unterschiedliche Bereiche des *CsACSI* Gens repräsentieren. Die ersten Hybridisierungsanalysen wurden mit *MspI* restringierter genomischer DNA von gynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanzen durchgeführt (siehe Abb. 3.15 in Kapitel 3.3.5.2).

Die 0,9kb Hybridisierungsbande ist aufgrund der zwei *MspI* Schnittstellen mit einem Abstand von 926bp innerhalb des Gens *CsACSI* zu erklären (siehe genomische Sequenz des Gens *CsACSI* in Abb. 3.7). Weitere Southern-Hybridisierungen, bei denen Sonden mit einer Homologie außerhalb dieses 926bp Sequenzabschnittes eingesetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß keine Hybridisierungsbande von 0,9kb (siehe Abb. 3.15B in Kapitel 3.3.5.2). Außerdem wurde mit allen eingesetzten Sonden, die eine Homologie zum 5`Ende des Gens *CsACSI* aufwiesen, die polymorphe 3,4kb Hybridisierungsbande detektiert. Der Einsatz von Sonden mit einer Homologie zum 3`Ende des Gens *CsACSI* zeigte jedoch bei allen Genotypen lediglich eine 0,9kb Hybridisierungsbande (siehe Abb. 3.15C). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte vermutet werden, dass das Gen *CsACSI* und das oben postulierte mutierte Allel (siehe Abb. 3.20 B) des Locus *CsACSIG* nur zum 5`Ende eine Homologie aufweisen oder dass ein Sequenzunterschied außerhalb des kodierenden Bereichs am 5`Endes zwischen dem Gene *CsACSI* und dem vermuteten mutierten Allel des Locus *CsACSIG* existiert.

Erst durch die Detektion weiterer RFLP-Marker (siehe Kapitel 3.3.5.1; Abb. 3.14) und dem erneuten Einsatz von Sonden mit einer Homologie zu unterschiedlichen Bereichen des *CsACSI* Gens (siehe Kapitel 3.3.5.2; Abb. 3.16) wurde der eindeutige Nachweis erbracht, dass das Gen *CsACSI* und das vermutete mutierte Allel (siehe grauer Bereich in Abb. 3.20 B) des Locus *CsACSIG* eine unterschiedliche Sequenz am 5`Ende aufweisen.

Mittels Erstellung einer Restriktionskarte (siehe Abb. 3.17; Kapitel 3.3.5.2) erfolgte anschließend die Durchführung einer Splinkerette-PCR und damit die Amplifikation der vermuteten, durch die Mutation entstandenen heterologen Sequenz (s.o.).

Damit gelang es, den Polymorphismus (Kapitel 3.3.5.1; Abb.3.14) mit der Sonden/Enzym-Kombination *acs1.3/MboI* durch einen direkten Vergleich der amplifizierten heterologen Sequenzen zu bestätigen (siehe Abb.3.18 in Kapitel 3.3.5.3).

Durch die anschließende direkte Amplifikation des vermuteten mutierten Allels des Locus *CsACSIG* bei gynözischen und subgynözischen Pflanzen aller genetischen Hintergründe (WrD, ED und ECD) mittels spezifischer Primer wurde der eindeutige Beweis für die Klonierung des mit dem dominanten *Acr*-Locus gekoppelten oder identischen Allels des Gens *CsACSIG* erbracht (siehe 3.19 in Kapitel 3.3.5.3).

Der Sequenzvergleich des 5`Endes zwischen dem Gen *CsACSI* und des nachgewiesenen mutierten Allels des Gens *CsACSIG* zeigte einen homologen Sequenzbereich von 409bp mit den für eine Transkription notwendigen *cis*-Elementen CAAT-Box und TATA-Box (ACC-Synthase, Tomate; LINCOLN et al. 1993; allgemein BUCHANAN et al. 2000). Die Detektion

eines auxininduzierenden *cis*-Elementes in dem Promotorbereich aller Allele der Gene *CsACSI* und *CsACSIG* (siehe Abb.3.18 in Kapitel 3.3.5.3) könnte eine mögliche Erklärung für die von TREBITSH et al. (1997) nachgewiesene Auxin induzierte Expression der Gene *CsACSI* bzw. *CsACSIG* sein (siehe Kapitel 3.1.2).

Da der transkriptionsregulierende Promotorbereich eines Gens bis zu 1000bp umfasst (BUCHANAN et al. 2000), kann der heterologen Bereich der Gene *CsACSI* und *CsACSIG* als Promotorsequenz definiert werden. Folglich könnte vermutet werden, dass der detektierte Sequenzunterschied der Promotorsequenz des mutierten Allels vom Locus *CsACSIG* den von KAMACHI et al. (2000) nachgewiesenen Expressionsunterschied zwischen gynözischen (*MM AcrAcr*) und monözischen (*MM acracr*) Linien verursacht. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch lediglich ein Teil des Promotorbereiches isoliert wurde, können über die weiteren molekulargenetischen Ursachen der von KAMACHI et al. (2000) nachgewiesenen ausschließlichen Expression des mutierten Allels vom *CsACSIG* Locus bei gynözischen und subgynözischen keine exakten Aussagen getroffen werden. Mit Hilfe der Restriktionskarte der Gene *CsACSI* und *CsACSIG* und durch den Einsatz der Splinkerette-PCR können jedoch in folgenden Arbeiten weitere Bereiche des 5`Endes amplifiziert und molekulargenetisch analysiert werden.

3.4.5 Nutzung der neuen Ergebnisse zur direkten Amplifikation des dominanten *Acr*-Allels

Der von TREBITSH et al. (1997) entwickelte RFLP-Marker bis heute bereits weltweit bei den verschiedensten Herkünften eingesetzt wurde. Dabei konnte keine Rekombination nachgewiesen werden (YE-BO et al. 2000; KAMACHI et al. 2000; zusammengefasst in PERL-TREVES 1999). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der von TREBITSCH et al. (1997) entwickelte RFLP-Marker erfolgreich zur Analyse der gynözischen, subgynözischen und phänotypisch andrözischen Pflanzen der drei genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD genutzt, ohne dass eine Rekombination zwischen dem dominanten *Acr* Allel und dem mutierten Allel des *CsACSIG* Locus zu beobachten war. Auf der Grundlage dieser RFLP-Analysen konnte das vermutete mutierte Allel des Gens *CsACSIG* (TREBITSH et al 1997) in der vorliegenden Arbeit isoliert werden.

Aufgrund der ausschließlichen Amplifikation dieses Allels des Gens *CsACSIG* bei allen untersuchten gynözischen und subgynözischen Pflanzen (insgesamt 72 Pflanzen) der genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD und aller bereits diskutierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 3.4.3 und 3.4.4) und anderer Arbeitsgruppen ist es sehr wahrscheinlich, dass das *Acr/acr* Gen isoliert wurde.

Damit kann der in der vorliegenden Arbeit entwickelte PCR-Marker zur direkten Amplifikation des dominanten *Acr*-Allels eingesetzt werden. Der Vorteil dieser PCR

gestützten Selektion besteht darin, dass nur kleine DNA Mengen mit einem geringen Reinheitsgrad verwendet werden können. Damit sind PCR-Analysen innerhalb eines Tages möglich, so dass im Gegensatz zur RFLP-Analyse viele Pflanzen innerhalb kurzer Zeit kostengünstig analysiert werden können.

Zukünftige Arbeiten, die insbesondere die molekulargenetische Analyse des 5'Endes des *CsACSIG* Locus zum Ziel haben sollten, werden zeigen, ob die von KUBICKI (1969b) nachgewiesene multiplen Allelie des *Acr/acr* Gens auch auf molekulargenetischer Ebene bestätigt werden kann. Außerdem kann erst durch die molekulargenetische Differenzierung des rezessiven *acr* Allele und des *CsACSI* Locus die in Abb. 3.20 dargestellten Theorie verifiziert werden.

4 Molekulargenetische Charakterisierung des *M/m* Gens

4.1 Einleitung

4.1.1 Klassisch genetische und physiologische Charakterisierung des *M/m* Gens

Das erstmals durch ROSA (1928) und TKACHENKO (1935) (zusammengefasst in ROBINSON et al. (1976) beschriebene *M/m* Gen verhindert im dominanten Zustand die Bildung von männlichen Blütenorganen, so dass weibliche anstatt zwittrige Blüten entstehen (GALUN 1961, SHIFRISS 1961, KUBICKI 1969c/d/e).

Physiologische Untersuchungen und daraus abgeleitete Theorien zur Wirkungsweise des *M/m* Gens weisen auf eine veränderte Ethylenreaktion im dritten Wirtel der Blüten hin. Diese führt zu einer lokalen Unterdrückung der Stamina und damit zu weiblichen Blüten (weiteres siehe Kapitel 2.1 und 2.4.3). Da eine Ausprägung des *M/m* Gens am eindeutigsten in weiblichen Blüten beobachtet werden kann, ist die Wirkung des *M/m* Gens abhängig vom *Acr/acr* bzw. *A/a* Gen (GALUN 1961, KUBICKI 1969a/b) (siehe auch Kapitel 2.1). Die Dominanz von *M* über *m* ist immer vollständig (TATLIOGLU 1983; BERNMAN et al. 1977).

Hermaphroditische (*mm AcrAcr*) Pflanzen unterscheiden sich von den entsprechenden gynözischen Pflanzen (*MM AcrAcr*) jedoch nicht nur dadurch, dass die weiblichen Blüten durch zwittrige ersetzt sind, sondern bilden außerdem neben den zwittrigen auch männliche Blüten aus (KUBICKI 1969e, SHIFRISS 1961). Dieser Effekt, der durch eine Kopplung des *M/m* Gens mit einem weiteren geschlechtsdeterminierenden Gen oder einer pleiotropen Wirkung des *M/m* Gens erklärt werden kann, wurde bereits in Kapitel 2.4.3 diskutiert.

Die Funktion des *M/m* Gens steht aufgrund der bis heute durchgeführten physiologischen Untersuchungen im engen Zusammenhang mit der Ethylenaktivität (Ethylenperzeption und Ethylensignaltransduktion). Daher werden in diesem Kapitel zur molekulargenetischen Charakterisierung des *M/m* Gens sowohl die Ethylenperzeption als auch die Ethylensignaltransduktion bei den gynözischen (*MM AcrAcr*) und den hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Genotypen untersucht. Dazu sollen die bereits bei anderen Pflanzen isolierten Ethylensignaltransduktionsgene auch bei der Gurke isoliert und in Verbindung mit der Funktion des *M/m* Gens analysiert werden. Aufgrund der zentralen Bedeutung der Ethylenperzeption und Ethylensignaltransduktion werden im folgenden Kapitel 4.1.2 diese Mechanismen ausführlich beschrieben.

Um jedoch auch bis heute unbekannte Gene zu isolieren und diese mit dem *M/m* Gen zu korrelieren, kommt in der vorliegenden Arbeit eine zweite Methode zur molekulargenetischen Charakterisierung des *M/m* Gens zum Einsatz. Diese zweite Strategie zur Isolierung und Charakterisierung des *M/m* Gens basiert auf einem Vergleich der Transkriptionsmuster von weiblichen und zwittrigen Blüten durch eine "Differential Display Reverse Transkription-PCR (DDRT-PCR) (LIANG et al. 1993). Diese Methode begründet sich auf der Annahme, dass jedes mRNA Molekül durch reverse Transkription und anschließende Amplifikation

darstellbar ist. Aufgrund der Isogenität des verwendeten Pflanzenmaterials sind nur Unterschiede bei den Transkriptionsprodukten solcher Gene zu erwarten, die entweder direkt vom *M/m* Gen stammen oder deren Transkription durch das *M/m* Gen beeinflusst wird.

4.1.2 Die Ethylensignalperzeption und Ethylensignaltransduktion

Die Ethylenkonzentration wird wie bereits in den Kapiteln 2.1 und 3.1 beschrieben, von den Enzymen ACC-Synthase und ACC-Oxidase reguliert und von Umweltbedingungen und Entwicklungsprozessen beeinflusst. Damit das Ethylen seine regulatorische Funktion in der Pflanze erfüllen kann, müssen die Zellen des Zielgewebes die Fähigkeit besitzen, Veränderungen der Ethylenkonzentration zu erkennen und diese Information in physiologische Reaktionen umzusetzen. Diese Reaktion kann innerhalb der Pflanze je nach Zelltyp sehr unterschiedlich sein. Für die Regulation dieser Mechanismen werden folglich verschiedene Rezeptoren mit hoher Affinität zum Ethylen benötigt (BURG und BURG 1967). Mit Hilfe von Arabidopsis-Knock-out-Mutanten konnte in den letzten Jahren ein linearer Signalübertragungsweg ausgehend von der Ethylenperzeption über die Ethylensignaltransduktion bis zur spezifischen Regulation der Genexpression aufgeklärt werden.

4.1.2.1 Die Ethylenrezeptoren und ihre Wirkungsweise

Die Ethylenrezeptoren konnten zunächst bei *Arabidopsis thaliana* und später auch bei anderen Pflanzenarten kloniert und charakterisiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur des N-Terminus können sie in zwei Sub-Familien eingeteilt werden. Die *ETR1* (ethylene response 1) ähnliche Subfamilie, zu der auch *ERS1* (ethylene response sensor 1) gehört, ist durch drei hydrophobe Ethylenbindungs-Domänen am N-Terminus und eine konservierte Histinin-Kinase Domäne gekennzeichnet (siehe Abb. 4.1).

Die zweite *ETR2* ähnliche Subfamilie, die durch *ETR2*, *EIN4* und *ERS2* repräsentiert wird, kann durch eine zusätzliche hydrophobe Ethylenbindungsdomäne am N-Terminus und durch eine degenerierte Histinin Kinase Domäne charakterisiert werden. In beiden Subfamilien existieren Ethylenrezeptoren, die keine Receiver Domäne am C-Terminus besitzen (*ERS1* und *ERS2*) (siehe Abb. 4.1) (BLEECKER 1999).

Von besonderer Bedeutung ist der N-Terminus, an dem die Ethylenbindung erfolgt. So konnte durch Mutationsstudien gezeigt werden, dass insbesondere Mutationen in diesem Bereich (128 Aminosäuren) zu einer veränderten Ethylenbindung führen (SCHALLER et al. 1995; HALL et al. 1998; zusammengefasst in BLEECKER et al. 1998).

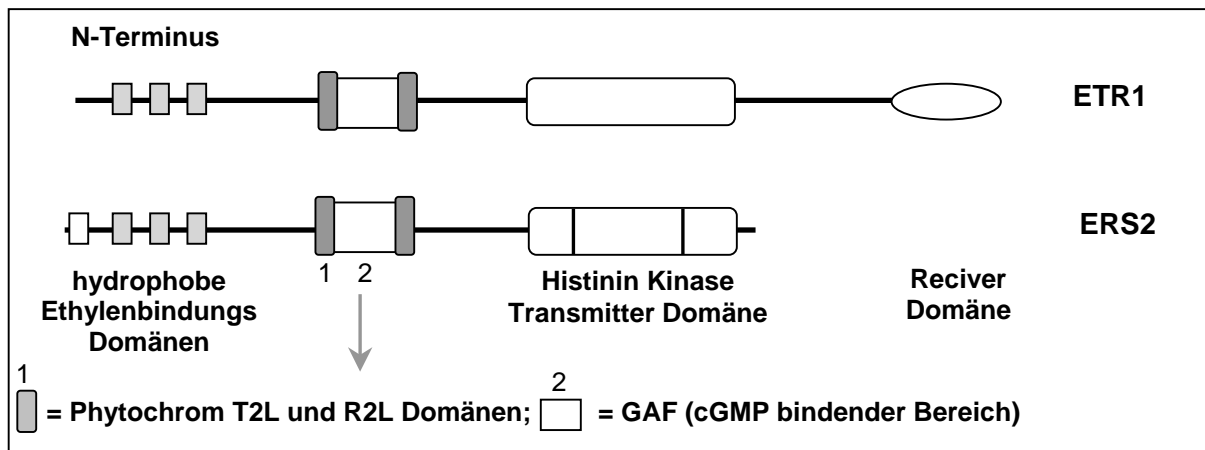


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der zwei Subfamilien der Ethylenrezeptoren als Beispiel *ETR1* und *ERS2* (nach BLEECKER et al. 1998 verändert).

Die Funktion der Ethylenrezeptoren soll im Folgenden am Beispiel des *ETR1* erläutert werden. Dieser Ethylenrezeptor agiert als Homodimer und ist mit dem N-Terminus, der drei hydrophobe Domänen enthält, membranassoziiert (siehe Abb. 4.1 und Abb. 4.2) (SCHALLER et al. 1995; BLEECKER et al. 1998). Die mittlere hydrophobe Domäne ist wahrscheinlich für die spezifische Bindung mit dem Cofaktor Kupfer verantwortlich, die erst eine hohe Affinität zur Ethylenbindung ermöglicht (RODRIGUEZ et al. 1999) (siehe Kapitel 2.2.4). Die Stimulation des Rezeptors durch die Bindung des Ethylens am N-Terminus führt an der Transmitter-Domäne zu einer Autophosphorylation des Histinins (siehe Abb. 4.1). Anschließend erfolgt durch die Aktivität der Kinase ein Phosphortransfer vom Transmitter zu der Aspartat-Region der Empfänger-Komponente (GAMBLE et al. 1998).

Der Rezeptor empfängt damit ein Signal und leitet es über die Zellmembran an Komponenten der Signaltransduktion im Cytoplasma weiter (siehe Abb. 4.2) (GAMBLE et al. 1998; BLEECKER 1999; WURGLER-MURPHY und SAITO 1997, FLUHR 1998).

Die Analyse isoformer Rezeptoren ergab, dass sich die Expression der Gene dieser Rezeptor-Familie je nach Gewebereich, Entwicklungsstadium und Ethylenkonzentration unterscheidet (HUA et al. 1998; LASHBROOK et al. 1998; TIEMAN und KLEE 1999). Bei dieser sehr komplexen Regulation der Reaktion auf Ethylen ist die Sensitivität der Ethylenrezeptoren ausschlaggebend (KIEBER 1997; FLUHR 1998; SAKAI et al. 1998; BLEECKER 1999; CHANG und SHOKEY 1999).

Bei der Gurke konnten bis heute drei für Ethylenrezeptoren kodierende Gene (*CsETR1*, *CsETR2* und *CsERS*) kloniert und sequenziert werden (YAMASAKI et al. 2000). Durch vergleichende Expressionsstudien zwischen gynözischen (*MM AcrAcr*) und monözischen (*MM acracr*) Pflanzen gelang es, eine erhöhte Expression der Gene *CsETR2* und *CsERS* in der Sprossspitze der gynözischen Pflanzen nachzuweisen. Bei den monözischen Pflanzen erfolgte nach einer Ethrel Applikation (Ethylen) eine den gynözischen Pflanzen ähnlich hohe Expression der Gene *CsETR2* und *CsERS*. Weiterhin führte eine AVG-Behandlung

(Hemmung der Ethylensynthese, siehe auch Kapitel 2.1.6) bei den gynözischen Pflanzen zu einer Reduzierung der *CsETR2* und *CsERS* Transkripte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression der Gene *CsETR2* und *CsERS* durch die endogene Ethylenkonzentration reguliert werden könnte (YAMASAKI et al. 2000). Da bei andromonözischen Pflanzen im Gegensatz zu monözischen Pflanzen keine erhöhte Transkription von *ETR2* und *ERS* nach einer Ethephon Behandlung nachgewiesen wurde (YAMASAKI et al. 2001), könnte diese ethylenabhängige Expressionsregulation vom *M/m* Gen beeinflusst werden (YAMASAKI et al. 2001). Eine solche ethylenabhängige Expression von Genen, die für Ethylenrezeptoren kodieren, konnte auch bei anderen Pflanzenarten nachgewiesen werden (LASHBROOK et al. 1998; TIEMAN und KLEE 1999).

Aufgrund der von YIN und QUINN (1995) bei der Ein-Hormonhypothese postulierten Korrelation des *M/m* Gens mit einem Ethylenrezeptor (siehe Kapitel 2.1.6) versuchten SARAF-LEVY et al. (2000) das Gen *CsERS* mit dem *M/m* Gen zu korrelieren. Es konnte jedoch keine Kopplung dieser Gene nachgewiesen werden (SARAF-LEVY et al. 2000).

Aufgrund der physiologischen Untersuchungen und den daraus abgeleiteten Theorien zur Wirkungsweise des *M/m* Gen Produktes konnte ein Einfluss auf die Ethylenrezeptoren vermutet werden. Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Ethylenrezeptoren im Zusammenhang mit der Ausprägung des *M/m* Gens untersucht. Dazu werden mittels Southern-Hybridisierung mit ethylenrezeptorspezifischen Sonden Kopplungsstudien bei nahe isogen gynözischen und hermaphroditischen Linien durchgeführt. Da es nach einer Ethephonbehandlung bei hermaphroditischen Geschlechtstypen zur Ausbildung von weiblichen Blüten kommen kann, ist das rezessive *M/m* Gen nicht, wie von PERL-TREVES (1999) und YAMASAKI et al. (2001) vermutet wurde, komplett funktionslos.

Daher kann diese unterschiedliche Reaktion auf die Ethylenkonzentration in Abhängigkeit vom Produkt des *M/m* Gens auch durch einen funktionellen Unterschied der Ethylenrezeptoren verursacht werden. Um diese unterschiedliche Sensitivität der Ethylenrezeptoren zu untersuchen, wird in der vorliegenden Arbeit die für den N-Terminus (Ethylenbindungs Domäne s.o.) kodierende Sequenz der Ethylenrezeptoren bei gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen verglichen.

4.1.2.2 Die Ethylensignaltransduktion

Die Signalweiterleitung des Ethylenrezeptors kann durch zwei alternative Modelle erklärt werden. Zum einen könnte der Rezeptor durch eine Ethylenbindung deaktiviert werden, so dass keine Aktivierung des negativ Regulators *CTR1* (constitutive triple response 1) erfolgen kann. Zum anderen könnte der Rezeptor durch die Ethylenbindung aktiviert werden und dadurch den nachgeschalteten negativ Regulator *CTR1* deaktivieren.

Sowohl bei dem Rezeptor aktivierenden als auch bei dem Rezeptor inaktivierenden Modell wird nach der Ethylenbindung an den Rezeptor der negativ Regulator *CTR1* ausgeschaltet (siehe Abb. 4.2) (BLEECKER et al. 1999). *CTR1* ist eine Protein-Kinase und führt im Cytoplasma zur Aktivierung einer MAP Kinase-Kaskade (MAP = mitogen-activated protein) (KIEBER et al. 1993; KIEBER 1997; WURGLER-MURPHY und SAITO 1997). Wird diese MAP Kinase Kaskade durch das CTR1 nicht aktiviert, ist die nukleusmembranassoziierte Domäne des *EIN2* (ethylene **i**nsensitive **2**) aktiv und führt zur Stimulierung der eigenen Carboxy-Terminal Domäne (siehe Abb. 4.2). Folglich wird *EIN2* aktiv, wenn *CTR1* inaktiv ist (SOLANO et al. 1998). Die aktive Carboxyl-Terminal Domäne des *EIN2* führt innerhalb des Nukleus zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *EIN3* (ethylene **i**nsensitive **3**).

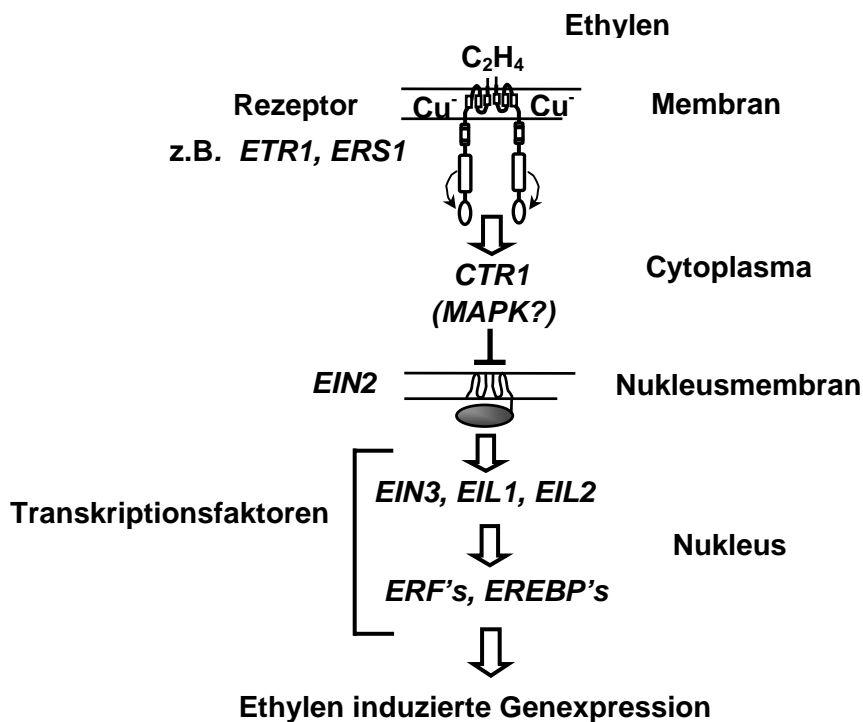


Abb. 4.2: Ethylensignaltransduktion bei *Arabidopsis* (nach CHANG, C. und SHOCKEY 1999; verändert).

Die *EIN3*-Gen-Familie, in die auch *EIL1*, *EIL2* und *EIL3* (ethylene **i**nsensitive 3 like **1**, **2** und **3**) einzuordnen sind, ist durch DNA-bindende Proteine gekennzeichnet. Diese Proteine der *EIN3* Familie fungieren als Positivregulatoren, die die Transkription der EREBP's (ethylene **r**esponsive **e**lement **b**inding **p**roteins) und ERF's (ethylene **r**esponsive **e**lement **b**inding **f**actors) steuern. Anschließend wird durch die Bindung der EREBP's bzw. ERF's an eine 'GCC box' der Promotorsequenz die Transkription der Ethylen induzierten Gene reguliert (SOLANO et al. 1998).

Bei der Gurke sind bisher keine Gene, die für Faktoren der Ethylensignaltransduktion kodieren, bekannt. Aufgrund physiologischer Untersuchungen besteht die Vermutung, dass

das *M/m* Gen für ein Element dieser Ethylensignaltransduktion kodiert. Folglich werden in der vorliegenden Arbeit die beteiligten Gene bei der Gurke genauer untersucht.

Da zum Beginn der Arbeiten lediglich einige Gene der Ethylensignaltransduktion bei *Arabidopsis* kloniert und charakterisiert waren, erfolgte zunächst die Korrelation der betreffenden Gene mit dem *M/m* Locus mittels Southern-Hybridisierung durch den Einsatz heterologer Sonden, die aus *Arabidopsis thaliana* amplifiziert wurden.

Nachdem Gene der Ethylensignaltransduktion auch bei anderen Pflanzenarten isoliert worden sind, konnte ein Homologievergleich durchgeführt werden. Aufgrund der damit bestimmten konservierten Bereiche der Ethylensignaltransduktionsgene sollen diese auch bei der Gurke isoliert und für weitere Sequenz- und Expressionsvergleiche zwischen isogen gynözischen (*MM AcrAcr*) und hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Linien eingesetzt werden.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Detektion von unterschiedlichen exprimierten mRNA's bei isogenen gynözischen und hermaphroditischen Linien des genetischen Hintergrundes WrD

Aufgrund der hohen Isogenität des verwendeten Pflanzenmaterials konnte zum Beginn der Arbeiten eine Methode verwendet werden, die auf einen Vergleich differentiell exprimierter mRNA's von isogen hermaphroditisch (*mm AcrAcr*) und gynözischen (*MM AcrAcr*) Genotypen basiert. Mit Hilfe dieser Methode sollen die Unterschiede zwischen weiblichen und hermaphroditischen Knospen im Transkriptionsmuster durch eine "Differential Display Reverse Transkription -PCR" (DDRT-PCR) (LIANG und PARDEE 1992) sichtbar gemacht werden. Die Methode basiert auf der Überlegung, dass jede mRNA durch reverse Transkription und anschließende PCR darstellbar ist. Dabei sind die verwendeten Primer so gewählt, dass letztlich die gesamte mRNA revers transkribiert wird, und die Visualisierung der entstehenden cDNA-Fragmente durch eine Aufteilung in verschiedene Reaktionen als distinkte Banden nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese möglich ist (LIANG et al. 1993; BAUER et al. 1993 und 1994). Für die Durchführung dieser Methode ist es nicht notwendig, die physiologische Funktion des zu isolierenden Gens zu kennen. Da jedoch bei der DDRT-PCR die unterschiedliche Expression von mRNA's untersucht wird, muss der Expressionsort des zu isolierenden Gens bekannt sein. Für das *M/m* Gen konnte dieser in Kapitel 2.3.2 aufgrund der Pfropfungsergebnisse in den Blütenknospen lokalisiert werden.

4.2.1.1 Pflanzenmaterial

Zur molekular genetischen Charakterisierung des *M/m* Gens dienten isogen gynözische (*MM AcrAcr*) und hermaphroditische (*mm AcrAcr*) Linien (siehe Abbildung 2.7 in Kapitel 2.2.1). Für die Detektion von unterschiedlich exprimierten mRNA's wurden weibliche und zwittrige Knospen von gynözischen bzw. hermaphroditischen Pflanzen des genetischen Hintergrundes WrD verwendet. Bei den anschließenden Korrelationsstudien durch Southern-Hybridisierungen bzw. RT-PCR Analysen wurde DNA bzw. RNA von isogenen Linien aus allen drei genetischen Hintergründen verwendet.

4.2.1.2 RNA-Isolierung

Aufgrund der in Kapitel 2.3.2 dargestellten Pfropfungsergebnisse konnte der Expressionsort des *M/m* Gens in den Blüten lokalisiert werden, so dass die Isolierung der Gesamt-RNA aus jungen Blütenknospen mit dem RNeasy Plant Kit (Fa. Quiagen) durchgeführt wurde. Um

verbliebene DNA Kontaminationen zu entfernen, wurden jeweils 150µg der RNA für 60min bei 25°C mit 60 units DNase I (Fa. Gibco-BRL) und 200 units RNase OUT (Fa. Gibco BRL) inkubiert. Der Reaktionsmix mit einem Endvolumen von 100µl enthielt 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl und 3mM MgCl₂. Nach dem Abbau der DNA erfolgte eine Extraktion mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) (Zentrifugation: 15min bei 5000xg). Der Überstand wurde erneut mit einem Volumen Chloroform extrahiert und für 15min bei 5000xg zentrifugiert. Die RNA-Fällung erfolgte anschließend aus dem Überstand mit einem Volumen Isopropanol und 0.1 Volumen 3M Natriumacetat über Nacht bei -20°C. Durch Zentrifugation für 30min bei 13000xg wurde die RNA pelletiert, in 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5min bei 13000xg zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde im Vakuum getrocknet und anschließend in Wasser resuspendiert. Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte über die Extinktionsmessung bei 260nm (SAMBROOK et al. 1989).

Verwendete Chemikalien:

- RNeasy Plant Kit (Fa. Quiagen).
- DNase I (Fa. Gibco-BRL)
- RNase OUT (Fa. Gibco BRL).
- Puffer und Reaktionsmix: wurde aus den mitgelieferten Puffer des jeweiligen Enzyms zusammengestellt.
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1), Chloroform, Isopropanol, 3M Natriumacetat, 70%iges Ethanol (v/v).

4.2.1.3 DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction)

Die Differential Display Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR) identifiziert differentiell exprimierte "mRNA species" (LIANG und PARDEE 1992). Der Poly-A-Schwanz der mRNA dient als Anlagerungsstelle der downstream-Primer bei der cDNA-Synthese. Diese erfolgt durch reverse Transkription in 12 Ansätzen mit jeweils einem downstream-Primer (D1-D12), der aus 11 Basen Thymin als Verankerungssequenz für den Poly-A-Schwanz besteht und dessen Spezifität durch zwei weitere Basen gegeben ist: 5'-T11XY-3' (X = A, C oder G; Y = A, C, G oder T).

Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, werden die 12 cDNA-Untergruppen anschließend mit dem gleichen Anker-Primer und jeweils einem von 26 verschiedenen Dekamer upstream-Primern in einer PCR amplifiziert (U1-U26; BAUER et al. 1993 und 1994). Der gleiche methodische Ansatz mit einem nichtradioaktiven Nachweis der DDRT-PCR-Fragmente wurde von LOHMANN et al. (1995) an Hydra-Zellen beschrieben und als REN-Display("Rapid and Efficient Method for Nonradioactive Differential Display") bezeichnet.

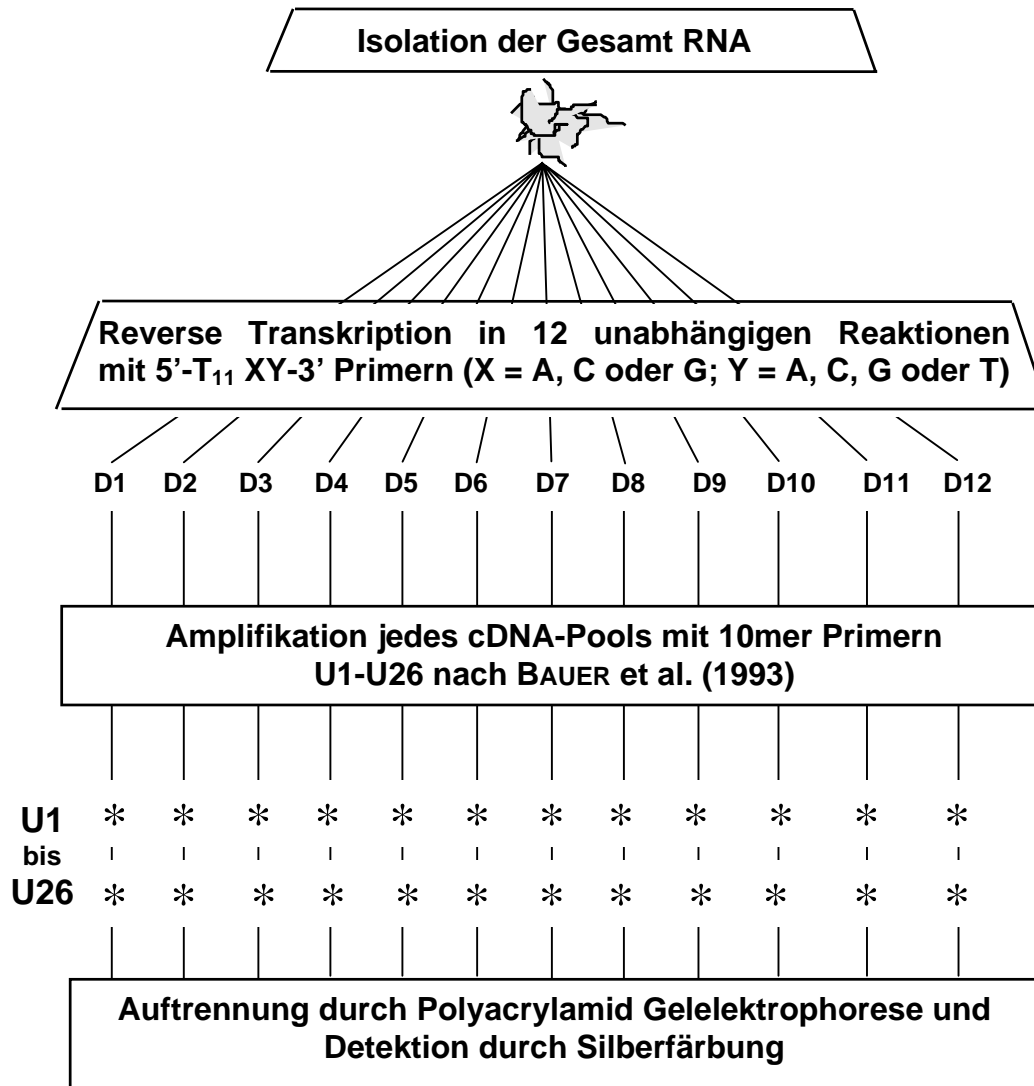


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der nicht radioaktiven DDRT-PCR.

Das nichtradioaktive Nachweisverfahren in Verbindung mit der DDRT-PCR wurde bei Pflanzen erstmals beim Schnittlauch eingesetzt (ENGELKE 1999).

Zur reversen Transkription wurden 0,5µg der Gesamt-RNA mit 0,25µM Anker-Primer (D1-D12, Fa. Biometra) für 10min bei 70°C in einem Volumen von 16µl inkubiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde, durch Zugabe von dNTPs (Endkonzentration: jeweils 25µM), DTT (10µM), Tris-HCl, pH 8,3 (50mM), KCl (75mM), MgCl₂ (3mM), 80 units RNase OUT (Fa. Gibco BRL) und nach der Inkubation für 2min bei 40°C, 400 units Reverstranskriptase (Superscript II, Fa. Gibco-BRL) ein Endvolumen von 40µl erreicht. Die anschließende Reverse Transkription erfolgte für 1h bei 40°C. Durch eine 5 minütige Inkubation bei 98°C wurden die Enzyme des Reaktionsmixes denaturiert. Die erhaltene cDNA wurde durch Zugabe von 20µl Wasser auf ein Endvolumen von 60µl verdünnt. Für die Differential Display – PCR wurden 2µl der cDNA in einem Reaktionsvolumen von 20µl eingesetzt. Der Ansatz enthielt 2,5µM downstream-Primer (D1-D12, entsprechend der reversen Transkription), 0,5µM des jeweiligen Dekamer upstream-Primers (U1-U26), 150µM dNTP (jedes), 1,5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH 8,8, 50mM KCl und 0,1% Triton X-100

und 1 unit Dynazyme (Fa. Biometra). Die PCR erfolgte in einem Gerät der Fa. Hybaid (TouchDown mit Deckelheizung) für 45 Zyklen mit 10sec bei 94°C zur Denaturierung, 1min bei 40°C für das "annealing" und 30sec bei 72°C zur Extension. Als Kontrolle wurde bei der vorangegangenen reversen Transkription der RNA in cDNA von jeder Probe ein Ansatz ohne reverse Transkriptase durchgeführt. Da bei dieser Kontroll-PCR nur einige schwache Banden amplifiziert wurden, die außerdem in den Probenansätzen nicht zu detektieren waren, kann davon ausgegangen werden, dass die RNA nicht mit DNA verunreinigt war. Weiterhin wurde bei der PCR eine Kontrolle ohne Zugabe von cDNA durchgeführt, um Verunreinigungen der Komponenten des PCR-Ansatzes ausschließen zu können.

Verwendete Chemikalien:

- Primer D1-D12 und U1-U26: Gene ExScreen-Primerkit (Fa. Biometra).
- Reverstranskriptase: Superscript II (Fa. Gibco-BRL)
- DNA-Polymerase: Dynazyme (Fa. Biometra).
- Puffer und Reaktionsmische: wurden aus den mitgelieferten Pufferlösungen für die Enzyme zusammengestellt (Fa. Biometra).

4.2.1.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

Verwendete Chemikalien:

- CleanGel Long 10 mit Tris-Phosphat/Borat Puffer pH 7,7 für "long distance separation" Fa. ETCelektrophoresetechnik.

4.2.1.5 Visualisierung der Fragmente durch Silberfärbung

Die Visualisierung der Fragmente mittels Silberfärbung erfolgte nach einem abgeänderten Protokoll von BASSAM et al. (1991) (weiteres siehe ENGELKE 1999). Die Gele wurden dazu für 45min bei 50°C in 500ml einer Ethanol-Essigsäurelösung fixiert, 3x für jeweils 10min in H₂Odest. gewaschen, für 45min in 400ml Silberlösung gefärbt, mit H₂Odest. abgespült und für 6-10min entwickelt (400ml Entwickler). Anschließend wurden die Gele für jeweils 20min in 500ml Stopbad und in 500ml Glycerinlösung imprägniert, bevor sie an der Luft für 2 Tage getrocknet wurden. Zum Schutz erfolgte dann eine Abdeckung mit einer Folie.

Verwendete Chemikalien:

- Fixierer:
 - 15% (v/v) Ethanol
 - 5% (v/v) Essigsäure.
- Silberlösung:
 - 0,1% (w/v) AgNO₃
 - frisch dazu geben: 400µl Formaldehyd (37%) pro 400ml Lösung.
- Entwickler:
 - 2,5% (w/v) Na₂CO₃
 - frisch dazu geben: 400µl Formaldehyd (37%) pro 400ml Lösung.
 - frisch dazu geben: 400µl einer 2%igen (w/v) Natrium-Thiosulfatlösung
 - Anmerkung: Die Natrium-Thiosulfatlösung sollte nicht länger als 1 Woche (bei 4°C) gelagert werden.

4.2.1.6 Reamplifikation und Isolierung der polymorphen Fragmente

Für die Reamplifikation wurde das polymorphe Fragment mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und in 30µl H₂O bidest. für 3 bis 4h rehydriert. Direkt nach dem Erhitzen für 5min bei 95°C erfolgte die Zerkleinerung des Polyacrylamidgelstückes. Nach der Zentrifugation für 10min bei 14000xg wurden 0,1- 2µl der im Überstand gelösten cDNA für einen Reamplifikationsansatz eingesetzt.

Die übrigen Komponenten dieses 20µl PCR-Ansatzes und das Temperaturprotokoll entsprachen denen der Differential-Display-PCR (siehe Kapitel 4.2.1.3).

Zur Klonierung der Fragmente wurden das Endvolumen der Reamplifikationsansätze auf 40 oder 60µl erhöht. Da neben den erwarteten noch einige kleinere Fragmente amplifiziert wurden, erfolgte eine Auftrennung in einem 2%igem Agarose-Gel (low melting small DNA, Fa. Biozym) in 1xTAE. Dem Gel waren 0,1µl Ethidiumbromid pro ml-Gellösung zugesetzt. Als Molekulargewichtsmarker diente eine 100bp-Leiter (Fa. Pharmacia). Der Ladepuffer wurde mit OrangeG eingefärbt. Die Fragmente mit der richtigen Größe wurden mit einem Skalpell aus den Gelen geschnitten, mit 1x Gelase-Puffer (Fa. Epicentre Technologie) versehen, für 3min bei 70°C geschmolzen und nach Abkühlung auf 45°C für 1h mit Gelase inkubiert. (Gelasemenge laut Herstellerangabe: Fa. Epicentre Technologie).

Verwendete Chemikalien:

- für die Reamplifikations-PCR-Ansätze wie in Kapitel 4.2.1.3
- Low melting small DNA - Agarose (Fa. Biozym)
- Elektrophoretische Probenauftrennung wie in Kapitel 3.2.6
- Gelase mit Puffer (Fa. Epicentre Technologie über Biozym)
- Verdünnungsreihe von λ-DNA
 - 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250ng.

4.2.1.7 Klonierung und Sequenzierung der polymorphen Fragmente

Die Einklonierung der eluierten cDNA-Fragmente und die anschließende Isolierung der Plasmide erfolgte wie bereits im Kapitel 3.2.6.6 beschrieben. Für die Sequenzierung wurden ca. 1,5 µg Plasmid DNA pelletiert und getrocknet. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech im Auftrag durchgeführt.

Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit im Internet frei zugänglicher Software Nukleotide BLAST® (ALTSCHUL et al. 1997) (weiteres siehe Kapitel 3.2.6.7).

4.2.1.8 Korrelationsstudien der detektierten Fragmente mittels Southern-Hybridisierungen

Für die Untersuchungen wurde genomische DNA von gynözischen (*MM AcrAcr*), hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) und am *M/m* Locus heterozygoten, gynözischen Pflanzen (*Mm AcrAcr*) aus den drei genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD (siehe Kapitel 2.2.1.1; Abb. 2.7) mit den Restriktionsenzymen *Dra*I, *Hind* III, *Eco* RI, *Eco* RV, *Msp*I und *Xba*I restringiert. Zusätzlich wurden aus dem genetischen Hintergrund WrD genomische DNA aus gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen mit den Restriktionsenzymen *Bcn* I, *Hin*6 I, *Msp* I, *Mva*I, *Taq* I, *Hinf* I, *Rsa* I, *Hae* III und *Mbo*I restringiert. Die Isolierung der DNA, ihre Restriktion und Übertragung auf eine N⁺ Nylon-Membran als auch die Southern-Hybridisierungen erfolgte wie in den Kapiteln 3.2.7 beschrieben.

Verwendete Chemikalien (siehe auch Kapitel 3.2.7)

- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Gibco BRL)
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Fermetas)
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. AGS)

4.2.1.9 Überprüfung der Expression der isolierten polymorphen DDRT-Fragmente

Um die unterschiedliche Expression der isolierten DDRT-Fragmente zu bestätigen, erfolgte nach der Konstruktion von spezifischem Primer (Tabelle 4.1) (Sequenzen siehe Anhang 7.6) eine Amplifikation mittels RT-PCR.

Die Isolierung der Gesamt-RNA für die RT-PCR Experimente erfolgte aus jungen Blütenknospen mit dem RNA Kit NucleoSpin® RNA II (siehe Kapitel 3.2.5). Bei diesem Kit werden mittels einer integrierten DNaseI Inkubation verbliebene DNA Kontaminationen entfernt, so dass eine DNase Restriktion und anschließende Aufreinigung, wie in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben wurde, entfällt. Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte über die Extinktionsmessung bei 260nm (SAMBROOK et al. 1989) oder wurde mit einer Verdünnungsreihe von λ-DNA auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,1µl Ethidiumbromid pro ml-Gellösung mittels einem Transilluminator (UV-Licht, 302nm) geschätzt.

Die RT-PCR wurde mittels OneStep RT-PCR Kit (Fa. Quiagen) durchgeführt. Bei diesem Kit erfolgt direkt nach der reversen Transkription die spezifische Amplifikation, so dass die vollständige Reaktion in einem Ansatz erfolgt. Der Reaktionsansatz wurde von 50µl (vom Hersteller angegeben) auf 25µl reduziert. Pro Reaktion wurden ca. 50ng gesamt RNA eingesetzt.

Die Optimierung der PCR-Bedingungen wurde zunächst mit genomischer DNA mittels eines Temperaturgradienten mit einer annealing Temperatur von 45- 62° C (weitere PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.2.6) durchgeführt. Die Intensitäts- und Größenbestimmung erfolgte durch die Auftrennung in einem 2%igen Agarosegel mit 0,1µl Ethidiumbromid pro ml-Gellösung mittels eines Transilluminators (siehe Kapitel 3.2.6)

PCR Bedingungen:

- 30 Min bei 50°C (reverse Transkription)
- 15 Min bei 95°C (Deaktivierung der reversen Transkriptase bzw. Aktivierung der Polymerase)
- für 45 Zyklen:
- 30 Sek. bei 94°C (Denaturierung)
- 1 Min. von 44°C bis 65°C je nach Primerpaar (annealing) (siehe Tab. 4.1)
- 2 Min bei 72°C (Polymerisation)
- abschließend 20 min bei 72°C

Tab. 4.1: Spezifische Primer der polymorphen cDNA-Fragmente.

Fragment Nr.	sense Primer antsense Primer	annealing Temp.	Größe
5	5' TTTCTACCCAACCTTCAT '3 5' TCACTTGCAAAGATTTTG '3	47°C	73bp
91	5' ATCCGATTGAAGATTG '3 5' AACTGTCACCCAAAGA '3	44°C	207bp
93	5' ATCTAACCGTATTTCC '3 5' TTCGTCCATCAAAGAAT '3	47°C	75bp
101	5' TTTTGTCCGACGAGTATT '3 5' ACGAAGCTGGGTTTAGTA '3	48°C	192bp
103	5' TTCGGTAGGATCAAGGTC '3 5' AAGTTTGGATATCGTCAA '3	45°C	56bp
129	5' TCGCAGTATGGAATATGA '3 5' GAAGCTCAATTAAGAACTT '3	49°C	84bp
247	5' CATAAGCCGCAAATAACA '3 5' TTTCAGCACAGACCCTAA '3	50°C	135bp
565	5' ACTGTGAACTTATTAAGCAC '3 5' TTCCAAAACAAAGGAAAC '3	46°C	99bp

Verwendete Chemikalien:

- RNA Kit, NucleoSpin ® RNA II (Fa. Machery und Nagel)
- Verdünnungsreihe von λ-DNA 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250ng
- OneStep RT-PCR Kit (Fa. Quiagen)
- Elektrophoretische Probenauftrennung wie in Kapitel 3.2.6

4.2.2 Charakterisierung und Isolierung von Genen der Ethylensignalperzeption und der Ethylensignaltransduktion zur spezifischen Aufklärung der molekularen Wirkungsweise des *M/m* Gens

4.2.2.1 Pflanzenmaterial

Zur Isolierung verschiedener Gene des Ethylenperzeptionsweges wurden isogene gynözische (*MM AcrAcr*) und hermaphroditische (*mm AcrAcr*) Linien der drei genetischen Hintergründe

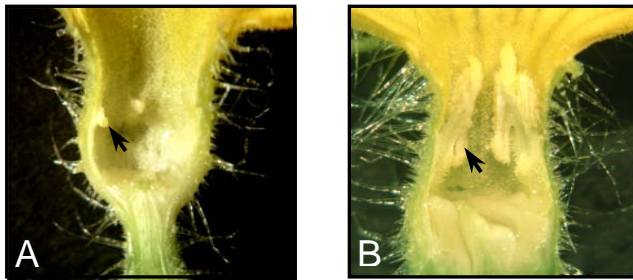


Abb. 4.4 : A) Degenerierte Stamina einer weiblichen Blüte (Pistillum wurde entfernt).

B) Voll entwickelte Stamina einer hermaphroditischen Blüte (Pistillum wurde entfernt).

WrD, ED und ECD verwendet (näheres siehe Kapitel 2.2.1). Die DNA Isolierung erfolgte aus jungen Blättern der jeweiligen Geschlechtstypen.

Zur RNA Isolierung wurden Wurzeln, junge Blätter, junge Blütenknospen und voll entwickelte und degenerierte männliche Blütenorgane

verwendet (siehe Abb. 4.4). Die Amplifizierung von spezifischen Sonden aus Sequenzbereichen der Ethylenperzeptionsgene erfolgte mit DNA aus jungen Blättern von *Arabidopsis thaliana* 'Columbia'.

4.2.2.2 DNA Isolierung

Die DNA Isolierung erfolgte mit der SST-Methode, die bereits im Kapitel 3.2.4 beschrieben wurde. Verwendet wurden junge Blätter von gynözischen (*MM AcrAcr*), hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) und von am *M/m* Locus heterozygoten gynözischen Pflanzen der F₁ Nachkommenschaft (*Mm AcrAcr*), der drei genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD (siehe Kapitel 2.2.1.1; Abb. 2.7) sowie junge Blätter von *Arabidopsis thaliana* 'Columbia'.

4.2.2.3 Amplifizierung, Einklonierung und Sequenzierung der Fragmente

Die Amplifikation spezifischer Bereiche von Genen der Ethylenperzeption erfolgte aus *Arabidopsis* (Sondenherstellung für Southern-Hybridisierungen siehe Kapitel 3.2.7) und aus genomischer DNA von *C. sativus*.

Die Konstruktion der spezifischen Primer Paare wurde mit Hilfe des Programms Primer Premier (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA) durchgeführt (weiteres siehe Kapitel 3.2.6.7)

Die als spezifische Primer eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert und werden in den Tabellen der jeweiligen Kapitel mit den entsprechenden annealing Temperaturen angegeben. Zur Bestimmung der annealing Temperatur wurde eine PCR mit einem Temperaturgradienten mit 8 Stufen von 45-65°C im PCR Gerät (TGradient Block der Fa Biometra) durchgeführt.

- 5 Min bei 94°C
- für 40 Zyklen:
- 30 Sek. bei 94°C (Denaturierung)
- 1 Min. von 45°C bis 65°C je nach Primerpaar (annealing Temperatur)
- 1,5 Min bei 72°C (Polymerisation)
- 1 Zyklus bei 72°C für 20 min

Verwendete Chemikalien siehe Kapitel 3.2.6

Die PCR-Produkte wurden, wie bereits in Kapitel 3.2.6 beschrieben, in einem 1 bis 2% Agarose Gel aufgetrennt. Die entsprechenden Fragmente wurden anschließend aus dem Agarosegel ausgeschnitten und bei 4°C gelagert. Für die weitere Nutzung erfolgte die Überführung der DNA Fragmente in ein Low meltig Agarosegel. Diese Low meltig Agarose konnte anschließend durch den Einsatz einer Agarase abgebaut werden (Protokoll siehe Kapitel 3.2.6.6).

Die so amplifizierte und aufgereinigte DNA Fragmente wurden dann, wie in Kapitel 3.2.6.6 bereits beschrieben, inkloniert und sequenziert oder direkt als Sonde bei den Southern-Hybridisierungen (siehe Kapitel 3.2.7) eingesetzt.

Verwendete Chemikalien:

- Low melting small DNA - Agarose (Fa. Biozym)
- Ethidiumbromid
- 100bp-Leiter (Fa. Pharmacia)
- Orange G-Ladepuffer (30% Glycerin, 0,25% Orange G)
- 1xTAE wie in Kapitel 3.2.5
- Agarase (0,2 U/ μ l) mit Puffer Fa. Roche
- Verdünnungsreihe von λ -DNA (Fa. Gibco BRL) 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250ng
- Chemikalien zur Inklonierung siehe Kapitel 3.2.6.6

4.2.2.4 Hybridisierungen mit *Arabidopsis* Sonden des Ethylenperzeptionsweges

Mitte der 90er Jahre konnten bei *Arabidopsis thaliana* erstmals Gene des Ethylenperzeptionsweges isoliert und molekulargenetisch charakterisiert werden. Zum Beginn der vorliegenden Arbeit standen folglich für eine spezifische Untersuchung des Ethylenperzeptionsweges bei *Cucumis sativus* in der NCBI Datenbank lediglich Sequenzen von *Arabidopsis* zur Verfügung. Daher wurden zunächst Sequenzbereiche der in Tabelle 4.2 aufgeführten Gene mittels spezifischer Primer in *Arabidopsis* amplifiziert

Tab. 4.2: Amplifizierung von Genen der Ethylensignaltransduktion aus *Arabidopsis*.

Gen-Name	Genbank-akzession	sense Primer antisense Primer	annealing Temp.	Größe
CTR1^a	LO8790	5' CGTCTTCGCCACCCCTAACAT '3 5' GAGGGCTACTCTCGCAGGAC '3	62°C	899bp
EIN2^b	AF141202	5' TGGTATTTGGGAGCAGTGAC '3 5' GCACGCAGGCTAGAGTATCT '3	55°C	1168bp
EIN3^b	AF004217	5' GTGCTACCTGGCTTGCTATT '3 5' TGTTGCCGCTACTGTTATG '3	55°C	897bp
ERF1^c	AF076278	5' TAAATTCCCATTTACCCCTT '3 5' ACTGCTCGATTAGACCGTAG '3	55°C	348bp
EIL1^d	AF004213	5' AGCCTGTGACTGGTGCTTCG '3 5' GGAGGGCATGACTCGGGATA '3	55°C	556bp
EIL2^d	AF004214	5' TCTTCTGATAATCTCCGTGAA '3 5' TAGGGTTTAGTTGGTTGGTA '3	62°C	878bp
EIL3^d	AF004215	5' CGCTTCAGATTATCGTTGTT '3 5' TTAGGCAGACCGAGTTTCAC '3	55°C	699bp
AtERF1^e	AB008103	5' TCCTCAACGACGCCTTTTAC '3 5' CCCTTATCCATTCCACCACC '3	58°C	490bp
AtERF2^e	AB008104	5' GAGCCAACTGAGAACTTTACG '3 5' ACACCTCACCTGCACCACCT '3	58°C	423bp
AtERF3^e	AB008105	5' CCATCTCCCTCATCTTCATC '3 5' GATGGTCTGGGTCCGCTAAA '3	58°C	550bp
AtERF4^e	AB008106	5' GCTACTAACCAGACCCACA '3 5' TAGCGAATCAGAGTCGCTTT '3	55°C	549bp
AtERF5^e	AB008107	5' GGCGACTCCTAACGAAGTAT '3 5' ACCGGTCAACTGGGAATAAC '3	55°C	895bp
AtERF6^e	AB013301	5' ATTGTCTCCGTTGCCTACTA '3 5' CTTTCTTACCACCTTCACTT '3	55°C	623bp
EREBP^f	AJ001911	5' TGTGGCGGTGCTATTATTTT '3 5' TAACTTGGTTGGTGGGATGG '3	58°C	160bp

^a : constitutive triple response 1^b : ethylene insensitive 2, 3^c : ethylene response faktor^d : ethylene insensitive 3 like 1, 2, 3^e : *arabidopsis thaliana* ethylene responsive element binding factor 1, 2, 3, 4, 5, 6^f : ethylene responsive element binding protein

Die so gewonnenen Sonden wurden anschließend zur Southern-Hybridisierung (Methode siehe Kapitel 3.2.7) bei *C. sativus* eingesetzt. Dabei wurden die genomische DNA von gynözischen (*MM AcrAcr*), hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) und gynözischen Pflanzen der F₁ Nachkommenschaft (*Mm AcrAcr*) der drei genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD nach der Restriktion mit *Dra* I, *Hind* III, *Eco* RI, *Eco* RV, *Msp* I und *Xba* I hybridisiert. Außerdem wurde die mit *Bcn*I, *Hin*6I, *Msp*I, *Mva* I, *Taq* I, *Hinf* I, *Rsa* I, *Hae* III und *Mbo* I restringierte genomische DNA von gynözischen und hermaphroditischen Linien des genetischen Hintergrundes WrD mit den Sonden *ctr1*, *ein2*, *ein3*, *erf1*, *eil1*, *eil2*, *eil3*, *at-erf1* bis 6 und *erebp* hybridisiert.

Verwendete Chemikalien

- PCR Bedingungen und verwendete Chemikalien siehe Kapitel 3.2.6
- Auftrennung und Aufreinigung siehe Kapitel 3.2.6.6
- Southern-Hybridisierung siehe Kapitel 3.2.7
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Gibco BRL)
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Fermentas)
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. AGS)

4.2.2.5 Amplifizierung und Sequenzanalysen der Ethylenrezeptoren bei *Cucumis sativus*

Die Amplifikation der spezifischen Bereiche von Genen der Ethylenrezeptoren erfolgte aus genomischer DNA von gynözischen (*MM AcrAcr*) und hermaphroditischen (*MM AcrAcr*) Pflanzen. Zur Bestimmung der annealing Temperatur wurde eine PCR mit einem Temperaturgradienten mit 8 Stufen von 45-65°C durchgeführt.

Tab. 4.3: Darstellung der ethylenrezeptorspezifischen Primer mit der verwendeten annealing Temperatur und der zu erwartenden Größe bei *C. sativus*.

Gen-Name	Genbank-akzession	Primer Name	sense Primer antisense Primer	annl. Temp.	Größe
CsETR1^a	AB026498	ETR1.1	5' ACTTGTTATTGCATTGAGCC '3 5' ATAAGTTCCGACAACACGCT '3	52°C	2186bp
		ETR1.2	5' TTGCATACTTCTCGATCCCA '3 5'TGCTACCTGATCAGCAACAA '3	55°C	830bp
CsETR2^a	AB026500	ETR2.1	5' TGGGTTTCTGATTTTGTAT '3 5' AACTGAACTGGTTTTCTGTAT '3	50°C	2226bp
		ETR2.2	5'TAGTTTATGGAGCATCGACAGC '3 5'CTGGTCAGCAACCACCTTTTT '3	58°C	881bp
		ETR2.3	5' GGCATTGCCATCTGGGTTTC '3 5' CACGTTTCATCAGAGTCGCCAC '3	55°C	782bp
CsERS^b	AB026499	ERS1	5' AGCTGAACAACCTTGACAGGGAG '3 5'ACCAACAGCACAGATCGGTAGA '3	55°C	995bp
		ERS2	5' CTTGCTTATTTCTCCATCCC '3 5' AAAGTGCAACAGCTACCTGG '3	54°C	831bp

^a : *Cucumis sativus* ethylen response 1 und 2

^b : *Cucumis sativus* ethylene response sensor.

Die amplifizierten und aufgereinigten DNA Fragmente (Methode siehe Kapitel 4.2.2.3) wurden, wie in Kapitel 3.2.6.6 bereits beschrieben, einkloniert und sequenziert oder direkt als Sonde bei den Southern-Hybridisierungen (Methode siehe Kapitel 3.2.7 und 4.2.2.4) eingesetzt.

Zur Detektion von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) zwischen den gynözischen (*MM AcrAcr*) und hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Linien, die dann mit dem *M/m* Gen korreliert werden könnten (siehe Kapitel 4.1.2.1), wurden die für den N-Terminus (Ethylenbindung) kodierenden Sequenzbereiche der drei Ethylenrezeptorgene (*CsETR1*, *CsETR2* und *CsERS*) bei gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen amplifiziert, einkloniert und sequenziert. Anschließend erfolgte ein Homologievergleich der Sequenzen mit dem Programm CltalW vom EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) (www.ebi.ac.uk/clustalw).

Verwendete Chemikalien (siehe auch Kapitel 3.2.6.6)

- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Gibco BRL)
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Fermentas)
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. AGS)
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. New England Biolabs)

4.2.2.6 Homologievergleiche von Genen der Ethylensignaltransduktion zur anschließenden Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung konservierter Sequenzbereiche bei *Cucumis sativus* L.

Der Homologievergleich wurde mit der im Internet zugänglichen Software NUCLEOTIDE BLAST (ALTSCHUL et al. 1997) durchgeführt. Dazu wurde mit einer bekannten Sequenz aus der NCBI Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) eines Gens der Ethylensignalkette (*Arabidopsis thaliana* oder *Cucumis melo*) nach konservativen Sequenzen anderer Pflanzenarten gesucht. Die für diesen Homologievergleich verwendeten Pflanzenarten sind in Tab. 7.28 in Anhang 7.7.1 zusammen mit der entsprechenden Genbankakzession aufgelistet. Die Länge des zu amplifizierenden konservierten Genabschnittes und die mit Hilfe des Programms Primer Premier aus diesen Sequenzen konstruierten spezifischen Primerpaaren sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Zur Bestimmung der ebenfalls in der Tabelle 4.4 angegebenen annealing Temperatur wurde eine PCR mit einem Temperaturgradienten mit 8 Stufen von 45-65°C durchgeführt (weiteres siehe Kapitel 3.2.6).

Tab. 4.4: Amplifizierung konservierter Sequenzbereiche von Genen der Ethylensignaltransduktion aus *Cucumis sativus* L..

Gen-Name ^x	Primer Name ^x	sense Primer antisense Primer	annealing Temp.	erw. Größe
CTR1	CsCTR1	5' CCTCCAAACTTGTCATT '3 5' GTGTACTTCTTATCAACCAA '3	51°C	220bp
EIN3	CsEIN3	5' AGGAGGAAGATGTCG '3 5' TTTGAGGAGGGTCCACAGT '3	53°C	343bp
EIL1	CsEIL1	5' GATAATTTGAGGGAATGG '3 5' GCAGTTAAAACACCGACT '3	47°C	371bp
EIL2	CsEIL2	5' CGGGCTCAAGATGGGATC '3 5' TTGGACTGGCGAACAAAGC '3	56°C	542bp
ERF1	CsERF1	5' GGGAAAGCATTATAGAGG '3 5' AAAGCGCAGCTCTGTCG '3	49°C	147bp
ERF4	CsERF2	5' TACAGAGGCGTTAGGAAGCG '3 5' CGAAAGTGCCAAGCCAGA '3	55°C	92bp
ERF6	CsERF3	5' GGCATTACAGAGGAGTGAGG '3 5' AAACCCGAGTTCCACGAC '3	45° bis 65°C ^y	84bp
EREBP	CsEREBP1	5' GAGATTTCGAGATCCACGA '3 5' CCATGGCAGCTTCTCCG '3	56°C	73bp

^x : Genbankakzessionen der zum Homologievergleich verwendeten Gene siehe Anhang 7.7.1; Tab. 7.28 (Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.2; Cs steht für *Cucumis sativus*)

^y : es konnte kein Fragment mit einer Homologie zu den bekannten Genen amplifiziert werden.

Die Amplifizierung der konservativen Sequenzbereiche der Gene *ERF1*, *ERF4* und *EREBP* erfolgte aus genomischer DNA (PCR siehe Kapitel 4.2.2.3). Die konservativen Sequenzbereiche der Gene *CTR1*, *EIN3*, *EIL1* und *EIL2* wurden aus cDNA mittels einer RT-PCR amplifiziert (Methode siehe Kapitel 3.2.6.5). Die DNA bzw. cDNA-Fragmente der entsprechenden Größe wurden anschließend aus dem zur Auftrennung genutzten Agarose Gel eluiert, inkloniert und sequenziert. Diese Methoden wurden bereits in Kapitel 3.2.6.6

beschrieben. Die Namen der bei der Gurke isolierten Gene werden im Folgenden mit der Abkürzung Cs für *Cucumis sativus* ergänzt.

4.2.2.7 Hybridisierung mit *C. sativus* spezifischen Sonden der Ethylensignaltransduktionsgene

Zur Korrelation der Gene der Ethylensignaltransduktion (siehe Kapitel 4.1.2.1) und der Ethylenrezeptoren (siehe Kapitel 4.1.2.2) mit dem *M/m* Gen wurden die bei der Gurke spezifisch amplifizierte DNA-Fragmente markiert und bei Southern-Hybridisierung als Sonden eingesetzt. Für die Hybridisierung wurde genomische DNA von gynözischen (*MM AcrAcr*), hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) und gynözischen Pflanzen der F₁ Nachkommenschaft (*Mm AcrAcr*) der drei genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD mit den Restriktionsenzymen *Dra*I, *Hind* III, *Eco* RI, *Eco* RV, *Msp*I und *Xba*I restringiert. Aus dem genetischen Hintergrund WrD wurde genomische DNA aus gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen mit den Restriktionsenzymen *Bcn* I, *Hin*6 I, *Msp* I, *Mva*I, *Taq* I, *Hinf* I, *Rsa* I, *Hae* III und *Mbo*I restringiert. Die Isolierung der DNA, ihre Restriktion und Übertragung auf eine N⁺ Nylon-Membran, als auch die Southern-Hybridisierungen erfolgten wie in den Kapiteln 3.2.7 beschrieben.

Verwendete Chemikalien

- Southern-Hybridisierung siehe Kapitel 3.2.7
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Gibco BRL)
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. MBI Fermetas)
- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. AGS)

4.2.2.8 Isolierung der vollständigen cDNA Sequenzen mittels 5'/3' RACE (Rapid Amplifikation of cDNA-Ends)

Die vollständige Isolierung der Gene (cDNA) der Ethylensignaltransduktion erfolgte mit einem 5'/3' RACE Kit der Fa. Roche. Diese Methode ermöglicht, ausgehend von einer bekannten Sequenz, die Amplifikation des unbekanntes 5' und 3'-Enden der zu isolierenden mRNA.

Für die Amplifikation des 5'-Endes wurde zunächst unter Verwendung eines spezifischen antisense Primers (asP₁; siehe Tab. 4.5) aus der bekannten Sequenz durch eine reverse Transkription ein cDNA-Strang synthetisiert (Abb. 4.5). Nach der Degeneration der ursprünglichen mRNA durch die Inkubation einer RNase erfolgte die Aufreinigung der verbliebenen cDNA mit dem High Pure PCR Produkt Purifications Kit (Fa. Roche). Durch den Einsatz einer Terminaltransferase wurde anschließend ein poly A-Schwanz an das 3' Ende synthetisiert. Mit Hilfe einer PCR, bei der ein Oligo dT Anker Primer als sense Primer und ein weiterer spezifischer antisense Primer (asP₂) (siehe Tab. 4.5) eingesetzt wurde, erfolgte die Amplifikation des 5' Endes der zu isolierenden mRNA (dann cDNA). (weitere Angaben siehe Handbuch des 5'/3' RACE Kit der Fa. Roche)

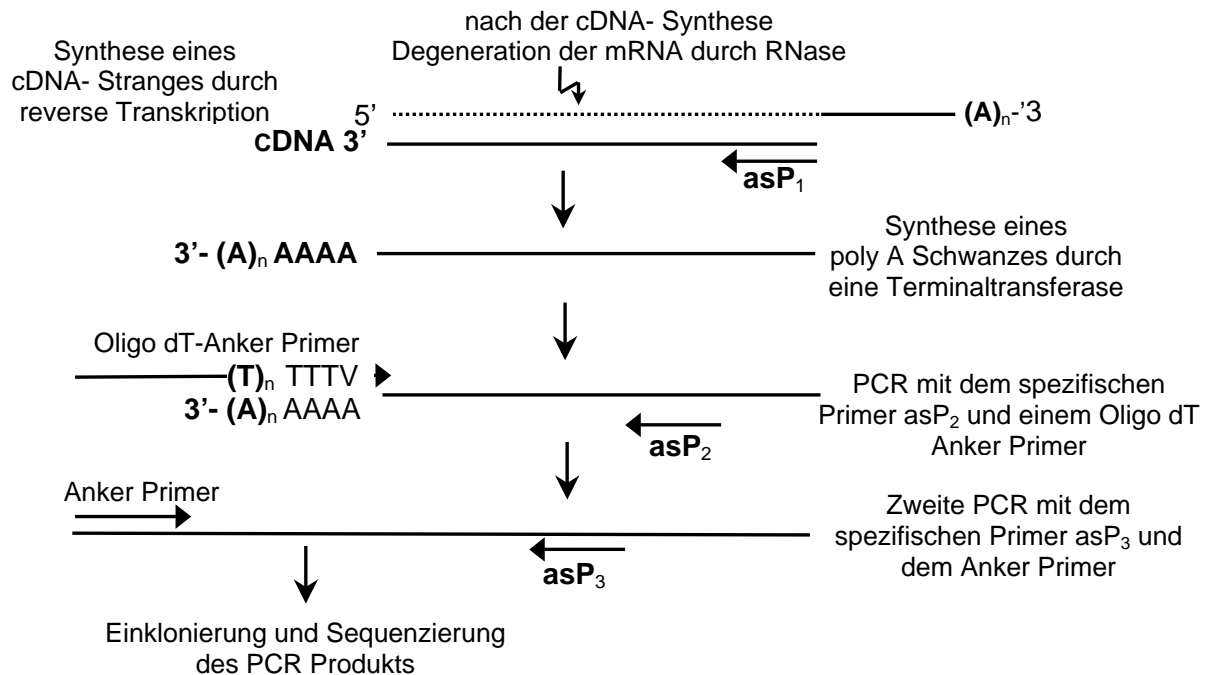


Abb. 4.5: Amplifizierung des unbekanntes 5'Endes der eingesetzten mRNA von einem bekannten Sequenzabschnitt .

Um die Spezifität der Amplifikation weiter zu erhöhen, bestand die Möglichkeit, mittels eines dritten antisense Primers (asP₃) (siehe Tab. 4.5) und eines Anker Primers als sense Primer eine zweite PCR durchzuführen. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde anschließend aus dem zur Auftrennung genutzten 2% Agarose Gel eluiert, einkloniert und sequenziert. Diese Methoden wurden bereits in Kapitel 3.2.6.6 beschrieben.

Tab. 4.5: Darstellung von antisense Primer zur Amplifikation des 5'Endes, ausgehend von den bekannten konservierten Bereichen der Ethylensignaltransduktionsgene bei *Cucumis sativus* L..

Gen-Name ^w	Größe	antisense Primer zur Amplifikation des 5'Ende cDNA ^x		
		asP ₁	asP ₂	asP ₃
CsCTR1	220bp	5'TCAAATCGCGATGA ACAATTGG 3'	5'CGTTTTGTGAAGATA ATTCATTCCCT 3'	5'CTACCCCTTGATAA GTATTCTGTT 3'
CsEIN3	343bp	5'TGTGAGGGGTTGG ACCGATTGAA 3'	5'TCTGCCTGGTACTT GGCTATGG 3'	5'CCCCGGTTACTGGT TTTCCCTTC 3'
CsEIL1	371bp	5'AAGCGAACCAAGA GTCGTGCTCT 3'	5'ACAATCATTACTCCC TCCAGAA 3'	5'ACAATCATTACTCCC TCCAGAA 3'
CsEIL2	542bp	5'TTGTTTTCCAGGAAT TGCGTGGTC 3'	5'CAATTGCTGCAGGG CCATTTCT 3'	5'CCCTTGAGCTTTGC AGACCTCCA 3'
CsERF1	147bp	5'CAGCAGCCCATTTT CCCCAC 3'	5'TCACGAATCTCAGC AGCCCAT 3'	5'CCGCAGCCTCGGCA GTGTCA 3'
CsERF2	92bp	5'ACCCTAGTTTTTCTT CCAAGGAT 3'	5'TCAGCAGCGTACCT ACCCCAAG 3'	5'AGAACGCTTCCTAA CGCCTCTG 3'
CsEREBP1	73bp	5'GGTGTTGAAAGTGC CGAGCCAAA 3'	5'TTGAAAGTGCCGAG CCAAACTC 3'	5'GCCGAGCCAAACTC GAACTCCT 3'

^w : Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.2; Cs steht für *Cucumis sativus*

^x : Zu Grunde liegende Sequenzen der konservativen cDNA-Abschnitte siehe Abb. 4.16 in Kapitel 4.3.2.2.3 (*CsERF2*) und Abb. 7.10 bis Abb. 7.22 in Anhang 7.7.1.

Die Isolierung des 3'Endes erfolgte durch eine cDNA-Synthese der gesamten mRNA mit Hilfe eines Oligo dT Anker Primers. Anschließend erfolgte die Degeneration der mRNA durch eine RNase Inkubation und einer anschließenden Aufreinigung mit dem High Pure PCR Produkt Purifications Kit (Fa. Roche). Diese cDNA wurde dann in einer PCR eingesetzt, bei der mit einem spezifischen sense Primer (sP₁) (Abb. 4.6) und einem antisense Anker Primer die Amplifikation des 3'Endes durchgeführt werden konnte.

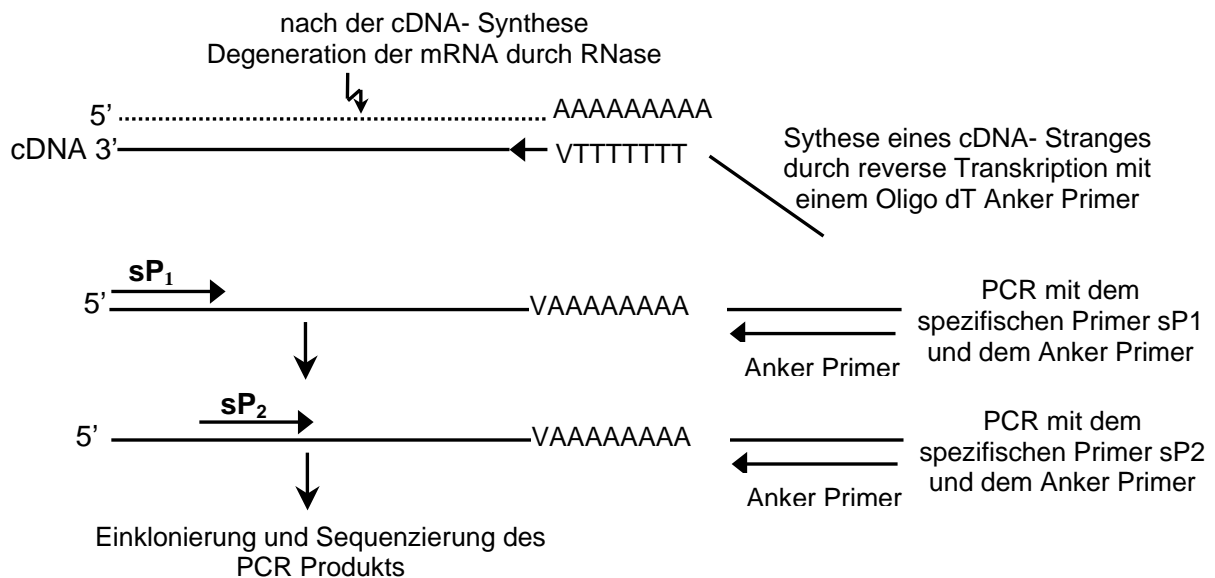


Abb. 4.6: Amplifizierung des unbekannten 3'Ende der eingesetzten mRNA von einem bekannten Sequenzabschnitt aus.

Um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen, wurde mittels eines weiteren spezifischen sense Primers (sP₂) (siehe Abb. 4.6) und dem antisense Anker Primer eine zweite PCR durchgeführt. Für diesen PCR Ansatz wurden 2 µl des 1 zu 20 mit H₂O verdünnten ersten PCR Ansatzes (sP₁) eingesetzt. (weitere Angaben siehe Handbuch des 5'/3' RACE Kit der Fa. Roche)

Tab. 4.6 : Darstellung der sense Primer zur Amplifikation des 3'Endes; ausgehend von den bekannten konservierten Bereichen der Ethylensignaltransduktionsgene bei *Cucumis sativus* L..

Gen-Name ^w	Größe	sense Primer zur Amplifikation des 3'Ende der cDNA	
		sP ₁	sP ₂
CsCTR1	220b	5'GGGCACGTGAATTCTTAGATGAG 3'	5'TGGCATATGATGTTGCAAAGGG 3'
CsEIN3	343b	5'GAGTGGTGGAAAGACAAAGTCAG 3'	5'GCTGCCATAGCCAAGTACCAGG 3'
CsEIL1	371b	5'TGGTCCAACACCGCATACGCTTC 3'	5'CGGCTTTGATGCAACATTGTGA 3'
CsEII2	542b	5'TTCCTGGAAAACAACAATGACTGC3'	5'TTCCATTGGAGGAGGGAGTTTC 3'
CsERF1^y	147b	5'AGGCTCAGACCGTGGGGAAAA 3'	5'TGCTGAGATTCGTGATCCAAAA 3'
CsERF2^z	92bp	5'CTTGGGGTAGGTACGCTGCTGAG 3'	5'TAGGGTCTGGCTTGGCACTTTC 3'
CsEREBP1	73bp	5'GAGTTTGGCTCGGCACTTTCAAC 3'	5'TTGGCTCGGCACTTTCAACACC 3'

^w : Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.2; Cs steht für *Cucumis sativus*

^x : Zu Grunde liegende Sequenzen der konservativen cDNA-Abschnitte siehe Abb. 4,16 in Kapitel 4.3.2.2.2 (*CsERF2*) und Abb. 7.10 bis Abb. 7.22 in Anhang 7.7.1.

Das amplifizierte 3' Ende wurde anschließend aus dem zur Auftrennung genutzten Agarose Gel eluiert, einkloniert und sequenziert. Diese Methoden wurden bereits in Kapitel 3.2.6.6 ausführlich beschrieben.

Die Sequenzen der zur Primerkonstruktion eingesetzten Genabschnitte aus *CsCTR1*, *CsEIN3*, *CsEIL1*, *CsEIL2*, *CsERF1* und *CsEREBP* werden im Anhang 7.7.1; Abb. 7.10 bis Abb. 7.22 dargestellt. Die aus der Lage der Primer und den bekannten konservierten Sequenzbereichen der Gene von *Arabidopsis* und *Cucumis melo* zu erwartenden Größen der 5'- und 3'-Enden der cDNA sind für jedes Gen in Tab. 4.7 dargestellt. Außerdem sind die spezifischen annealing Temperaturen für jeden Primer in Tab. 4.7 angegeben. Die annealing Temperatur wurde bei den Primern sP₁ und asP₁ aufgrund des T_m Wertes (nach Angabe der Firma MWG Biotech AG) ermittelt. Für die anschließenden Amplifikationen mit den Primern sP₂, asP₂ und asP₃ erfolgte die Bestimmung der annealing Temperatur (siehe Tab. 4.7) mit einer Temperaturgradienten-PCR mit 8 Stufen (45-65°C).

Tab. 4.7: Erwartete Größen zum 3' bzw. 5' Ende beim Einsatz der jeweiligen spezifischen sense (Tab. 4.6) und antisense Primern (Tab. 4.5) mit der entsprechenden annealing Temperatur.

Gen-Name ^w	3' Ende der cDNA				5' Ende der cDNA					
	sP ₁		sP ₂		asP ₁		asP ₂		asP ₃	
	erw. Größe ^z	An.-Temp.	erw. Größe ^z	An.-Temp.	erw. Größe ^z	An.-Temp.	erw. Größe ^z	An.-Temp.	erw. Größe ^z	An.-Temp.
<i>CsCTR1</i>	550bp	56°C ^x	510bp	55°C ^y	2000bp	49°C ^x	970bp	55°C ^y	1900bp	55°C ^y
<i>CsEIN3</i>	1340bp	54°C ^x	1300bp	61°C ^y	530bp	55°C ^x	480bp	59°C ^y	380bp	62°C ^y
<i>CsEIL1</i>	1200bp	53°C ^x	1150bp	56°C ^y	570bp	54°C ^x	510bp	54°C ^y	460bp	58°C ^y
<i>CsEIL2</i>	1360bp	53°C ^x	1200bp	58°C ^y	500bp	52°C ^x	400bp	57°C ^y	350bp	59°C ^y
<i>CsERF1</i>	340bp	52°C ^x	315bp	54°C ^y	550bp	58°C ^x	540bp	58°C ^y	480bp	59°C ^y
<i>CsERF2</i>	580bp	58°C ^x	530bp	59°C ^y	150bp	52°C ^x	110bp	62°C ^y	90bp	60°C ^y
<i>CsEREBP1</i>	420bp	58°C ^x	416bp	60°C ^y	330bp	58°C ^x	327bp	58°C ^y	300bp	62°C ^y

^w : Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.2; **Cs** steht für ***Cucumis sativus***

^x : Annealing Temperatur wurde aufgrund des T_m Wertes (nach Angabe der Firma MWG BiotechAG) ermittelt

^y : Bestimmung der annealing Temperatur mit einer Temperaturgradienten PCR (45-65°C)

^z : Zu Grunde liegende Sequenzen der konservativen cDNA-Abschnitte siehe Abb. 4,16 in Kapitel 4.3.2.2.3 (*CsERF2*) und Abb. 7.10 bis Abb. 7.22 in Anhang 7.7.1.

Verwendete Chemikalien:

- Amplifikation Auftrennung, Aufreinigung siehe Kapitel 3.2.6
- Einklonierung und Sequenzierung siehe Kapitel 3.2.6.6
- 5'/3'RACE Kit (Fa. Roche)
- High Pure PCR Produkt Purifications Kit (Fa. Roche)
- Primersynthese (Fa. MWG Biotech AG)

4.2.2.9 Expressionsanalysen von Genen der Ethylenperzeption und Ethylensignaltransduktion bei spezifischem Gewebe des dritten Wirtels (Antheren)

RNA Isolierung

Aufgrund der in Kapitel 2 dargestellten und diskutierten Ergebnisse erfolgt die Expression und die Wirkung der *M* Allels sehr lokal im dritten Wirtel der weiblichen Blüte (siehe Kapitel 2.1.2 und 2.4.3) (siehe auch Kater et al. 2001). Daher wurde die Gesamt-RNA aus degeneriertem Antherengewebe weiblicher und aus entwickelten Antherengewebe zwittriger Knospen (siehe Kapitel 4.1.2.1; Pflanzenmaterial Abb. 4.4) mit dem RNA Kit (NucleoSpin® RNA II) isoliert. Um die Expression der erstmals bei der Gurke isolierten Ethylensignaltransduktionsgene in verschiedenen Organen der Pflanze zu untersuchen, wurden auch aus Wurzeln, jungen Blättern und weiblichen Blütenknospen gynösischer Linien RNA isoliert.

Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte mit einer Verdünnungsreihe von λ -DNA auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,1 μ l Ethidiumbromid pro ml-Gellösung mittels einem Transilluminators (UV-Licht, 302nm).

Verwendete Chemikalien:

- RNA Kit, NucleoSpin® RNA II (Fa. Machery und Nagel)
- Verdünnungsreihe von λ -DNA: 50, 100, 150, 200, 250, 300ng

RT-PCR

Da die Funktion des *M/m* Gens in direkter Abhängigkeit zur Ethylenaktivität steht, könnte von dem Produkt des *M/m* Gens eine direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der Ethylensignalperzeption bzw. -transduktionsgene vermutet werden. Um diesen Einfluss zu untersuchen wurde, eine RT-PCR (OneStep RT-PCR Kit der Fa. Quiagen) mit dem Einsatz spezifischer Primer durchgeführt (Methode und RT-PCR Protokoll, wie bereits in Kapitel 3.2.6.5 erläutert).

Zur Amplifikation der Ethylenrezeptoren wurden die Primerpaare CsETR1.2, CsETR2.2, CsETR2.3, CsERS1 und CsERS2 eingesetzt (Primer und annealing Temperaturen siehe Tab. 4.3 in Kapitel 4.2.2.5). Die spezifische Amplifikation der Ethylensignaltransduktionskettengene erfolgte mit den Primern CsCTR1, CsEIN3, CsEIL1, CsEIL2 und CsERF1 (siehe Tab. 4.4 in Kapitel 4.2.2.5) mit der entsprechenden annealing Temperatur dargestellt werden. Für die Gene *CsERF2* und *CsEREBP* wurden Primer außerhalb des konservativen Bereichs abgeleitet, da damit eine spezifischere Amplifikation möglich wird (siehe Tab. 4.8).

Die Expressionsintensität wurde durch die fluoreszenz der ethidiumbromidgefärbten Fragmente nach Auftrennung in einem 2%igen Agarosegel verglichen (siehe Kapitel 3.2.6).

Tab. 4.8: Darstellung von Primern zur spezifischen Amplifikation der Gene *CsERF2* und *CsEREBP*.

Gen-Name ^x	Primer Name	sense Primer antisense Primer	annealing Temp.	Grösse
<i>CsERF2</i>	CsERF2.1	5' AAATACCCAATTCAACCATTCA'3 5' CCCTAGTTTTCTTCCAAGGATC'3	50° C	131bp
<i>CsERF2</i>	CsERF2.2	5' CCAATTCAACCATTTCAGCC'3 5' GTCGTCCATCATCCAAACATCC'3	52° C	489bp
<i>CsEREBP</i>	CsEREBP1.1	5' ATGTGCGGTGGTGCCATTATCT '3 5' GCGGTGTTGAAAGTGCCGAGCC'3	55° C	311bp

^x: Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.3.

Verwendete Chemikalien:

- OneStep RT-PCR Kit (Fa. Quiagen)
- Elektrophoretische Probenaufreinigung wie in Kapitel 3.2.6

4.2.2.10 Sequenzvergleiche der Ethylensignaltransduktionsgene von hermaphroditischen und weiblichen Genotypen

Nach der Amplifikation der konservativen Sequenzbereiche der Gene *CsCTR1*, *CsEIN3*, *CsEIL1*, *CsEIL2*, *CsERF1*, *CsERF2* und *CsEREBP*, die mittels RT-PCR (siehe Kapitel 4.2.2.9) aus der Gesamt-RNA des degenerierten Antherengewebes (weiblichen Knospen) und aus Antherengewebe (zwitteriger Knospen) erfolgte, wurden die Fragmente aufgereinigt, inkloniert und sequenziert. (siehe Kapitel 3.2.6.6).

Der direkte Vergleich der Sequenzen erfolgte mit dem Programm ClustalW vom EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) (www.ebi.ac.uk/clustalw) (siehe Kapitel 3.2.6).

4.3 Ergebnisse

4.3.1 DDRT-PCR

4.3.1.1 Nachweis differentiell exprimierter mRNAs bei weiblichen und zwitterigen Knospen

Durch die Detektion differentiell exprimierter mRNA's bei weiblichen und hermaphroditischen Knospen mit Hilfe der DDRT-PCR konnten pro Primerkombination (12 x 26) im Durchschnitt 47 cDNA-Fragmente ausgewertet werden. Aufgrund des direkten Vergleiches, der in einer Gelmatrix dargestellten cDNA-Fragmente weiblicher und hermaphroditischer Knospen, konnten bei beiden Geschlechtstypen polymorphe Banden nachgewiesen werden. In Abb. 4.7 sind als Beispiel Fragmentmuster mit zusätzlichen Banden bei weiblichen Knospen nach Amplifikation mit den Primerkombinationen D 5/U17 bis D5/U21 dargestellt.

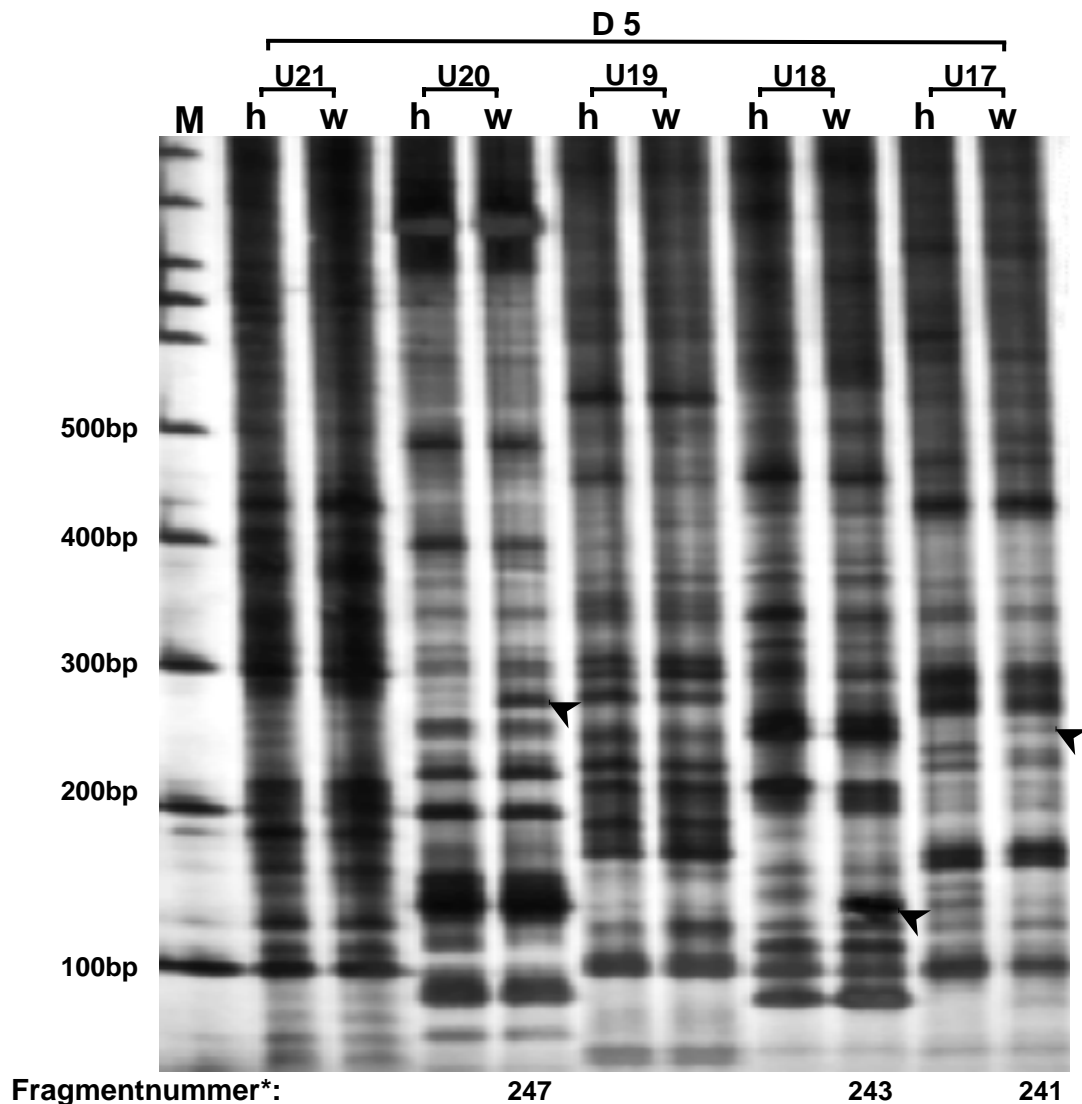


Abb. 4.7: Ausschnitt eines DDRT-PCR Gels

Die Pfeile zeigen zusätzlich amplifizierte cDNA-Fragmente bei weiblichen Knospen
*siehe auch Tab. 4.10 in Kapitel 4.3.1.2.

In Tab. 4.9 sind die Ergebnisse der Auswertung differentiell amplifizierter cDNA-Fragmente bei weiblichen und hermaphroditischen Knospen dargestellt. Die Summen der zusätzlichen cDNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bis 1000bp sind für jeden der 12 cDNA-Pools

Tab. 4.9: Anzahl der cDNA- Fragmente die entweder bei den weiblichen Knospen oder bei den zwittrigen Knospen als zusätzliche Banden in der DDRT-PCR nachgewiesen wurden.

cDNA- Pool	weibliche Knospen	zwittrige Knospen
1	6	7
2	5	4
3	2	7
4	1	6
5	7	9
6	2	5
7	2	12
8	0	4
9	5	12
10	3	11
11	3	7
12	3	4
Σ	39	88

angegeben (siehe Tab. 4.9). Insgesamt konnten bei den weiblichen Knospen 39 zusätzlich amplifizierte cDNA-Fragmente detektiert werden. Damit zeigen die weiblichen Knospen in der Summe aller 12 cDNA-Pools einen Anteil von 0,27% zusätzlich amplifizierter Banden. Weiterhin gelang es bei hermaphroditischen Knospen 88 für diesen Blütentyp spezifische cDNA-Fragmente nachzuweisen. Daraus ergab sich ein Anteil von 0,61% zusätzlich amplifizierter cDNA-Banden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, mittels der zusätzlich amplifizierten cDNA-Banden der

weiblichen Knospen die mRNA des dominanten *M/m* Gens zu detektieren. Da nur durch die blütenspezifische Transkription des dominanten *M/m* Gens bei den gynözischen Linien (*MM AcrAcr*) weibliche Blüten entwickelt werden, erfolgt die weitere Analyse der 39 polymorphen Banden der weiblichen Knospen.

4.3.1.2 Analyse der detektierten cDNA-Fragmente mittels Southern-Hybridisierungen und Sequenzanalysen

Für die weitere Analyse wurden alle 39 zusätzlich amplifizierten cDNA-Fragmente der weiblichen Knospen aus dem Polyakrylamidgel eluiert und reamplifiziert.

In Tab. 4.10 sind die 39 verschiedenen Fragmentnummern mit den eingesetzten Primern dargestellt. Die 'erwartete Größe' (siehe Tab. 4.10) gibt die geschätzte Länge der aus dem Polyakrylamidgel eluierten polymorphen Banden an. Nach der Reamplifizierung konnten jedoch bei 12 cDNA-Fragmenten lediglich kleinere Fragmente amplifiziert werden (siehe Tab. 4.10; ⁶).

Durch den Einsatz der cDNA-Fragmente bei Southern-Hybridisierungen zeigten 27 Fragmente auswertbare Hybridisierungsmuster. Da einige Sonden zu einem identischen Hybridisierungsmuster führten, konnten insgesamt 19 verschiedene Hybridisierungsmuster nachgewiesen werden.

Tab. 4.10: Analyse der in den weiblichen Knospen zusätzlich detektierten DDRT-PCR Fragmente.

Primer		Fragment bzw. Sonden Nummer	erw. Größe ²	gef. Größe ³	Hybridisierungsintensität ⁴	Homologievergleich in der Datenbank NCBI ⁵	
D ¹	U ¹					Genbank-akzession ⁷	Organismus
1	3	5 ^x	100bp	85bp	+++	keine Homologie	
	6	11 ^a	200bp	185bp	-	keine Homologie	
	9	17,1 ^{b,x}	160bp	155bp	++++	AF275345	<i>Lycopersicon esculentum</i>
		17,2 ^{b,z,x}	220bp	155bp ⁶	++++	AF275345	<i>Lycopersicon esculentum</i>
	10	19 ^{c,x}	230bp	121bp ⁶	-	keine Homologie	
26	29	130bp	114bp ⁶	-	keine Homologie		
2	20	91,1 ^{d,x}	130bp	132bp	+++	keine Homologie	
		91,2 ^{d,y,x}	300bp	281bp	++++	keine Homologie	
	21	93 ^x	300bp	127bp ⁶	+++	keine Homologie	
	25	101 ^{b,x}	300bp	290bp	++++	AF275345	<i>Lycopersicon esculentum</i>
3	26	103 ^{c,x}	130bp	122bp	+++	keine Homologie	
	13	129 ^x	320bp	114bp ⁶	+++	keine Homologie	
4	24	151	150bp	~150bp	++	x	
	23	201	150bp	106bp ⁶	+	keine Homologie	
5	2	211	220bp	218bp	+	AC010105.12	<i>Homo sapiens</i>
	5	217 ^{b,x}	150bp	149bp	++++	AF275345	<i>Lycopersicon esculentum</i>
	11	229	250bp	128bp ⁶	+	keine Homologie	
	17	241 ^{b,x}	250bp	207bp ⁶	+++	AF275345	<i>Lycopersicon esculentum</i>
	18	243	130bp	132bp	-	keine Homologie	
	20	247 ^w	280bp	194bp ⁶	+++	keine Homologie	
6	24	255	140bp	128bp	+	keine Homologie	
	15	289	250bp	~190bp ⁶	++	x	
7	18	295	200bp	193bp	++	keine Homologie	
	14	339	150bp	128bp ⁶	-	keine Homologie	
9	15	341	270bp	164bp ⁶	-	AC122940.3	<i>Homo sapiens</i>
	5	425	130bp	135bp	-	AF236855	<i>Gallus gallus</i>
	6	427	140bp	139bp	+	keine Homologie	
	15	445	350bp	361bp	-	keine Homologie	
10		449,1	200bp	116bp	-	AL445675.9	<i>Homo sapiens</i>
	17	449,2	350bp	190bp	++	keine Homologie	
10	5	477 ^{b,x}	350bp	141bp ⁶	++++	AF275345	<i>Lycopersicon esculentum</i>
		513,1 ^{b,x}	240bp	232bp	++++	AF275345	<i>Lycopersicon esculentum</i>
	23	513,2 ^{b,x}	1,0kb	232bp ⁶	++++	AF275345	<i>Lycopersicon esculentum</i>
11	16	551	150bp	157bp	+	AF269372	<i>Staphylococcus epidermis</i>
	23	565 ^w	220bp	237bp	+++	NT-036288.1	<i>Oryza sativa</i>
	24	567	280bp	296bp	+	keine Homologie	
12	6	583 ^a	120bp	113bp	-	keine Homologie	
	13	597	150bp	136bp	-	keine Homologie	
	24	619	150bp	154bp	-	AL929581.5	<i>Homo sapiens</i>

^a : Identische Hybridisierungsmuster und zueinander homologe Sequenzen (Anhang 7.6; Abb. 7.5)

^b : Identische Hybridisierungsmuster und zueinander homologe Sequenzen (Anhang 7.6; Abb. 7.6)

^c : Identische Hybridisierungsmuster und zueinander homologe Sequenzen (Anhang 7.6; Abb. 7.7)

^d : Identische Hybridisierungsmuster und zueinander homologe Sequenzen (Anhang 7.6; Abb. 7.8)

¹ : Erklärung der D und U Primer siehe Abb. 4.3 in Kapitel 4.2.1.3

² : Aus dem Polyakrylamidgel eluierte polymorphe Bande

³ : Reamplifiziertes, inkloniertes und sequenziertes cDNA-Fragment

⁴ : Hybridisierungsintensität: (++++= klar erkennbares Hybridisierungsmuster bis + = schwaches Hybridisierungsmuster; - keine Hybridisierungssignale zu erkennen)

⁵ : Homologievergleich mit Nucleoid BLAST (Homologielänge siehe Anhang 7.6; Tab. 7.27)

⁶ : Reamplifiziertes Fragment kleiner als das detektierte polymorphe cDNA-Fragment

⁷ : Genauere Beschreibung siehe (Anhang 7.6; Tab. 7.27)

^w : Expression in der Blüte konnte nicht bestätigt werden (Abb. 4.9)

^x : Expression in der Blüte konnte bestätigt werden (Abb. 4.9)

^y : Hybridisierungsmuster siehe Abb. 4.8 (A)

^z : Hybridisierungsmuster siehe Abb. 4.8 (B)

^x : Sequenzierung konnte nicht ausgewertet werden.

In Abb. 4.8 werden Beispiele von zwei verschiedenen Hybridisierungsmustern dargestellt. Durch den Einsatz der Sonde 91,2 (Abb. 4.8 A) zeigte sich kein Unterschied im Hybridisierungsmuster der gynözischen und hermaphroditischen Linien. Wenn jedoch die Sonde 17,2 verwendet wurde, zeigte sich nach der Restriktion mit *Hin6I* bei den hermaphroditischen Linien ein zusätzliches Hybridisierungssignal im Hybridisierungsmuster (siehe Pfeil in der Abb. 4 B). Dieser Polymorphismus konnte auch durch den Einsatz der Sonden 17,1; 101; 217; 241; 477; 513,1 und 513,2, die ein identisches Hybridisierungsmuster zeigten, nachgewiesen werden. Aufgrund dieses zusätzlichen Signals wurde die Hybridisierung mit der entsprechenden Enzym-Sondenkombination (*Hin6I*/17,2) mit gynözischen und hermaphroditischen Linien aus den Genpools WrD, ED und ECD wiederholt. Dabei zeigte sich, dass der aufgetretene Polymorphismus nicht mit dem rezessiven *M/m* Gen gekoppelt ist. Da das detektierte zusätzliche Hybridisierungssignal (siehe Pfeil in Abb. 4.8) auch bei gynözischen Genotypen (*MM AcrAcr*) zu beobachten war. Bei allen weiteren getesteten Sonden konnte kein Unterschied im Hybridisierungsmuster der gynözischen bzw. hermaphroditischen Linien nachgewiesen werden, so dass eine Kopplung zum *M/m* Gen nicht untersucht werden konnte.

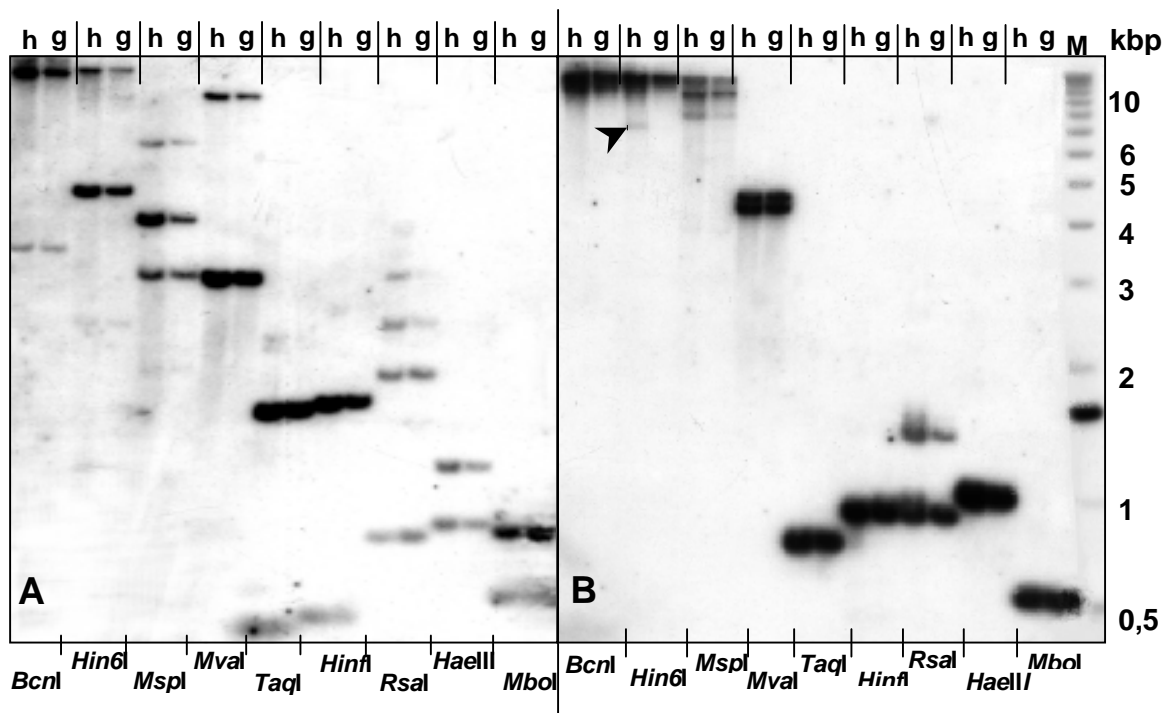


Abb. 4.8: Hybridisierungsmuster von hermaphroditischen (h) und gynözischen (g) Pflanzen nach Restriktion mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Hybridisierung mit den cDNA-Fragmenten 91,2 (A) und 17,2 (B). Der Pfeil zeigt ein zusätzliches Signal (ca. 7,5 kbp) nach Restriktion mit *Hin6I* bei gynözischen Pflanzen.

Durch das Einklonieren und die anschließende Sequenzierung der Fragmente konnten die Hybridisierungsergebnisse weiter erklärt werden. So zeigte sich, dass einige Fragmente zueinander homologe Sequenzen aufweisen (siehe Tab. 4.10; ^{a,b,c} und ^d). Nach der

Durchführung von Homologievergleichen gelang es, 14 cDNA-Fragmente in 4 verschiedene Gruppen einzuteilen (Homologievergleiche siehe Anhang 7.6; Abb. 7.5 bis Abb. 7.8). Während drei dieser homologen Fragmentgruppen jeweils zwei cDNA-Fragmente enthalten, konnten in einer Gruppe 8 homologe Fragmente eingeordnet werden (siehe Homologievergleich; Anhang 7.6; Abb. 7.6).

Bei 13 Fragmenten fungierte der U-Primer (sense Primer) als sense und als antisense Primer, so dass kein Poly A Schwanz detektiert wurde. Außerdem wurden 3 Fragmente amplifiziert, bei denen der D Primer (antisense Primer) als sense und als antisense Primer fungiert hat (cDNA-Sequenzen mit markiertem Primerbindungsbereich, siehe Anhang 7.6; Abb. 7.9).

Aufgrund des Homologievergleiches innerhalb der NCBI Datenbank konnten nur Homologien von weniger als 30bp zu bereits bekannten pflanzlichen Genen nachgewiesen werden (siehe Anhang 7.6; Tab. 7.27). So wurde für die homologe Fragmentgruppe (siehe Tab. 4.10;^b) mit den Fragmentnummern 17,1; 17,2; 101; 217; 241; 477; 513,1 und 513,2 eine Homologie von 24bp mit einem nicht kodierenden Sequenzbereich eines 12kb langen Klons aus *Lycopersicon esculentum* nachgewiesen.

Außerdem konnte eine Homologie von 26bp zwischen dem Fragment 201 und dem Promotorbereich eines MYB-Transkriptionsfaktors von *Anthriscum majus* nachgewiesen werden. Das Fragment 567 wies zu einem BAC-Klon des Chromosoms 10 aus *Qryza sativa* eine Homologie von 20bp auf.

Die vier Fragmente 211, 341, 425 und 619 zeigen eine hohe Homologie zu verschiedenen BAC-Klonen von *Homo sapiens*. Weiterhin konnte eine Homologie des Fragmentes 341 von 73bp zu dem Gen GART-B aus *Gallus gallus* und eine Homologie von 144bp des Fragmentes 551 zu einem Sr1 Klon aus *Staphylococcus epidermis* nachgewiesen werden.

4.3.1.3 Transkriptionsanalyse der detektierten mRNA's mittels RT-PCR

Zur Bestätigung der differentiellen Transkription der detektierten mRNA's in weiblichen und zwittrigen Knospen wurden für die cDNA-Fragmente, die ein eindeutiges Hybridisierungsmuster bei der Southern-Hybridisierung zeigten (siehe Abb. 4.10), spezifische Primer konstruiert.

Mit Hilfe dieser Primer wurde anschließend mittels RT-PCR die Transkription der entsprechenden Gene bei weiblichen und zwittrigen Knospen genauer untersucht (siehe Abb. 4.9). Die Gene, aus denen die Fragmente 5, 91, 93, 101, 103 und 129 amplifiziert wurden, zeigten in weiblichen und zwittrigen Knospen keine unterschiedliche Expression. Damit konnte die bei der DDRT-PCR nachgewiesene differentielle Expression für diese cDNA's nicht bestätigt werden.

Außerdem konnte weder in weiblichen noch in zwittrigen Knospen eine Transkription der mRNA's, aus denen die cDNA-Fragmente 247 und 565 amplifiziert wurden, nachgewiesen

werden (siehe Abb. 4.9; Pfeil 1). Der Nachweis der Expression des Gens, aus dem das Fragment 91 amplifiziert wurde, erfolgte erst nach einer Optimierung der RT-PCR (siehe Abb. 4.9; B).

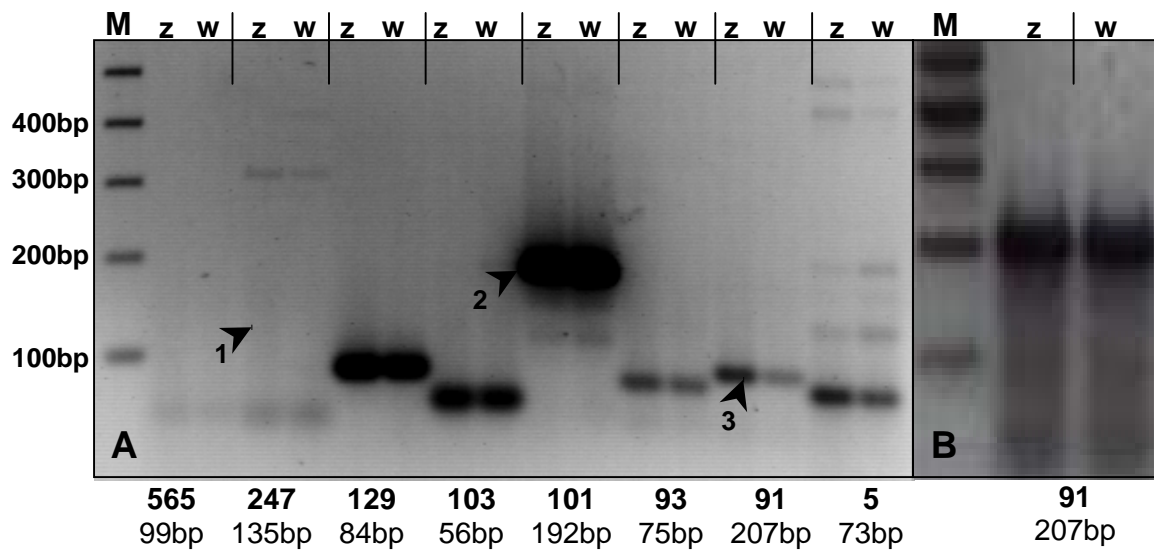


Abb. 4.9: (A) :Expressionsanalyse mittels RT-PCR mit RNA aus zwittergen (z) und weiblichen (w) Knospen.

Pfeil 1: Keine Expression des Gens aus dem das Fragment 247 amplifiziert wurde.

Pfeil 2: Expression des Gens aus dem das Fragment 101 amplifiziert wurde.

Pfeil 3: Expression eines Gens mit einer zu geringen Größe (aufgrund der detektierten cDNA werden 207bp erwartet);siehe (B).

(B) Wiederholung der RT-PCR mit dem Primerpaar 91 nach einer PCR Optimierung.

4.3.2 Analyse der Ethylenperzeption und Ethylensignaltransduktion

Wie bereits in Kapitel 2.4.3 und 2.4.4 diskutiert, deuten die physiologischen Untersuchungen darauf hin, dass das Produkt des *M/m* Gens einen Einfluss auf die Ethylenperzeption oder aber auf die Ethylensignaltransduktion hat. Im folgenden Kapitel werden daher verschiedene Kopplungsstudien mit den Genen der Ethylenperzeption und Ethylensignaltransduktion mit der Ausprägung bzw. Funktion des *M/m* Gens (hermaphroditische und gynözische Geschlechtsausprägung) untersucht.

4.3.2.1 Molekulare Charakterisierung der Ethylenrezeptoren *CsETR1*, *CsETR2* und *CsERS* bei gynözischen und hermaphroditischen Linien

Aufgrund der postulierten unterschiedlichen Ethylensensitivität des weiblichen und hermaphroditischen Blütengewebes erfolgte eine Untersuchung von spezifischen Sequenzbereichen der für Ethylenrezeptoren kodierenden Gene. Eine veränderte Ethylensensitivität kann durch Sequenzunterschiede der Ethylenrezeptoren bedingt sein. Von besonderer Bedeutung für die Ethylensensitivität ist der für den N-Terminus kodierende Sequenzabschnitt, da dieser Bereich für die hydrophobe Ethylenbindungs-Domänen des Ethylerezeptors kodiert (siehe Kapitel 4.1.2.1). Mit Hilfe spezifischer Primer erfolgte die Amplifizierung des entsprechenden Sequenzbereiches der Gene *CsETR1*, *CsETR2* und *CsERS* bei gynözischen und hermaphroditischen Linien. Um diese für Ethylenrezeptoren kodierenden Gene mit dem *M/m* Gen zu korrelieren, wurden die entsprechenden spezifisch amplifizierten Fragmente bei Southern-Hybridisierungen mit gynözischen und hermaphroditischen Linien durchgeführt.

Tab. 4.11: Hybridisierung mit Sonden aus Genen der Ethylenperzeption (Ethylenrezeptoren).

Name ^w der Sonde	aus <i>C. sativus</i> amplifizierte Grösse	Hybridisierung nach Restriktion ^y mit <i>DraI</i> , <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> und <i>V</i> , <i>MspI</i> und <i>XbaI</i>	Hybridisierung nach Restriktion ^z mit <i>BclI</i> , <i>Hin6I</i> , <i>MspI</i> , <i>MvaI</i> , <i>TaqI</i> , <i>HinfI</i> , <i>RsaI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>MboI</i>	Korrelation mit dem <i>M/m</i> Gen
<i>cs-etr1.2</i>	830 bp ^x	++++ [*]	++++ [*]	nein
<i>cs-etr2.2</i>	881 bp ^x	++++ [*]	+++ [*]	nein
<i>cs-etr2.3</i>	782 bp ^x	+++ [*]	++++ [*]	nein
<i>cs-ers</i>	995 bp ^x	++++ [*]	++++ [*]	nein

^w: Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.3; Cs steht für *Cucumis sativus*

^x: Die DNA Fragmente wurden inkloniert und sequenziert siehe Abb. 4.10 und Anhang 7.8; Abb. 7.27 und Abb. 7.28

^y: genomische DNA von gynözischen (*MM AcrAcr* und *Mm AcrAcr*) und hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Linien aus den genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD

^z: genomische DNA von gynözischen (*MM AcrAcr*) und hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Linien aus dem genetischen Hintergrund WrD

^{*}: Hybridisierungsintensität: ++++= klar erkennbares Hybridisierungsmuster; +++ = Hybridisierungsmuster mit zum Teil undeutlichen Signalen.

In Tab. 4.11 werden die eingesetzten Sonden mit dem entsprechenden Hybridisierungsergebnis dargestellt. Die Hybridisierungsmuster der hermaphroditischen und gynözischen Linien zeigten jedoch keine Unterschiede, so dass die Korrelation bzw. Kopplung zwischen einem Ethylenrezeptor kodierenden Gen und dem *M/m* Gen nicht untersucht werden konnte.

Zur weiteren Analyse der Ethylenrezeptoren bei gynözischen und hermaphroditischen Linien wurde der für die Ethylenbindungsdomäne kodierende Sequenzbereich der bekannten Ethylenrezeptoren der gynözischen und hermaphroditischen Linien kloniert und sequenziert.

Der anschließende Homologievergleich des für den N-Terminus kodierenden Bereichs der Gene *CsETR1*, *CsETR2* und *CsERS* zwischen hermaphroditischen und gynözischen Linien zeigte keinen Unterschied.

		Bereich IV^x		
<i>CsETR2</i>	h	--TGGCATTGCCATCTGGGTTTCTGATTTTGTATTACTGGCATCTGTTTCTGCTGCCG		59
<i>CsETR2</i>	g	--TGGCATTGCCATCTGGGTTTCTGATTTTGTATTACTGGCATCTGTTTCTGCTGCCG		59

<i>CsETR2</i>	h	ACAACGGATTTCCGAGATGTAATTGTGATGATGAGGGTAGTTTATGGAGCATCGACAGC		118
<i>CsETR2</i>	g	ACAACGGATTTCCGAGATGTAATTGTGATGATGAGGGTAGTTTATGGAGCATCGACAGC		118

		Bereich I^x		
<i>CsETR2</i>	h	ATTTTGGAGTGTGAGCGTGTGAGTGATTTTTTGGATTGCTGTGGCCTACTTCTCTATTCC		177
<i>CsETR2</i>	g	ATTTTGGAGTGTGAGCGTGTGAGTGATTTTTTGGATTGCTGTGGCCTACTTCTCTATTCC		177

<i>CsETR2</i>	h	TATTGAACTTCTCTATTTTCGTTAGTTGCTCCAATGTACCCTTCAAATGGGTTCTATTTTC		237
<i>CsETR2</i>	g	TATTGAACTTCTCTATTTTCGTTAGTTGCTCCAATGTACCCTTCAAATGGGTTCTATTTTC		237

		Bereich II^x		
<i>CsETR2</i>	h	AGTTTATTGCCTTCATGGTTCTATGTGGGTTGACCCATTTGCTCAATGGCTGGACTTAT		297
<i>CsETR2</i>	g	AGTTTATTGCCTTCATGGTTCTATGTGGGTTGACCCATTTGCTCAATGGCTGGACTTAT		297

		Bereich III^x		
<i>CsETR2</i>	h	GGCCCCACTCATTCCAATTGATGCTAGCTCTCACTGTCTTCAAATTTCTTACCGCCCT		357
<i>CsETR2</i>	g	GGCCCCACTCATTCCAATTGATGCTAGCTCTCACTGTCTTCAAATTTCTTACCGCCCT		357

<i>CsETR2</i>	h	GGTTTCCTGTGCTACTGCTATAACCCTCATCACACTCATTCTTTGCTTCTCAAGGTGA		417
<i>CsETR2</i>	g	GGTTTCCTGTGCTACTGCTATAACCCTCATCACACTCATTCTTTGCTTCTCAAGGTGA		417

Abb. 4.10: Sequenzvergleiche (N Terminus) mit eingezeichneten hydrophoben Bereichen der Ethylenbindungsstelle bei *ETR2* der gynözischen (g) und der hermaphroditischen (h) Linie.
^x: kodiert für den hydrophoben Ethylenbindungsbereich des Ethylenrezeptors *ETR2* (siehe auch Abb. 4.1 in Kapitel 4.1.2.1).

In Abb. 4.10 ist der Homologievergleich zwischen dem N-Terminus des Gens *CsETR2* aus gynözischen und hermaphroditischen Linien des genetischen Hintergrundes WrD dargestellt.

Der Homologievergleich zwischen gynözischen und hermaphroditischen Linien der für den N-Terminus kodierenden Sequenz der Gene *CsETR1* und *CsERS* zeigte ebenfalls keinen Unterschied und wurde aus diesem Grund nicht dargestellt.

Die Ursache der unterschiedlichen Ethylensensitivität des Blütengewebes könnte neben einer funktionellen Veränderung der Ethylenperzeption auch durch eine unterschiedliche Expression der Ethylenrezeptorgene bedingt sein. Um diesen möglichen

Expressionsunterschied innerhalb von weiblichen und hermaphroditischen Knospen zu untersuchen, wurde eine RT-PCR mit Ethylenrezeptor spezifischen Primern durchgeführt. In Abb. 4.11 A wird die Transkriptionsintensität der Gene *CsETR1*, *CsERS* und *CsETR2* bei weiblichen und hermaphroditischen Knospen dargestellt. Da in beiden Knospentypen keine unterschiedliche Expression der Ethylenrezeptorgene nachgewiesen werden konnte, erfolgte eine weitere Transkriptionsanalyse mit RNA aus entwickelten und degenerierten Stamina junger zwittriger und weiblicher Knospen.

Diese Analyse zeigte, dass das Gen *CsETR1* nicht in dem dritten Viertel der weiblichen und hermaphroditischen Knospe exprimiert wird (siehe Abb. 4.11 B, Pfeil 2). Weiterhin konnte mit zwei Primerpaaren eine stärkere Expression des Gens *CsERS* in den degenerierten Stamina der weiblichen Knospen; als in den entwickelten Stamina der hermaphroditischen Knospen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.11, Pfeil 1 und 3).

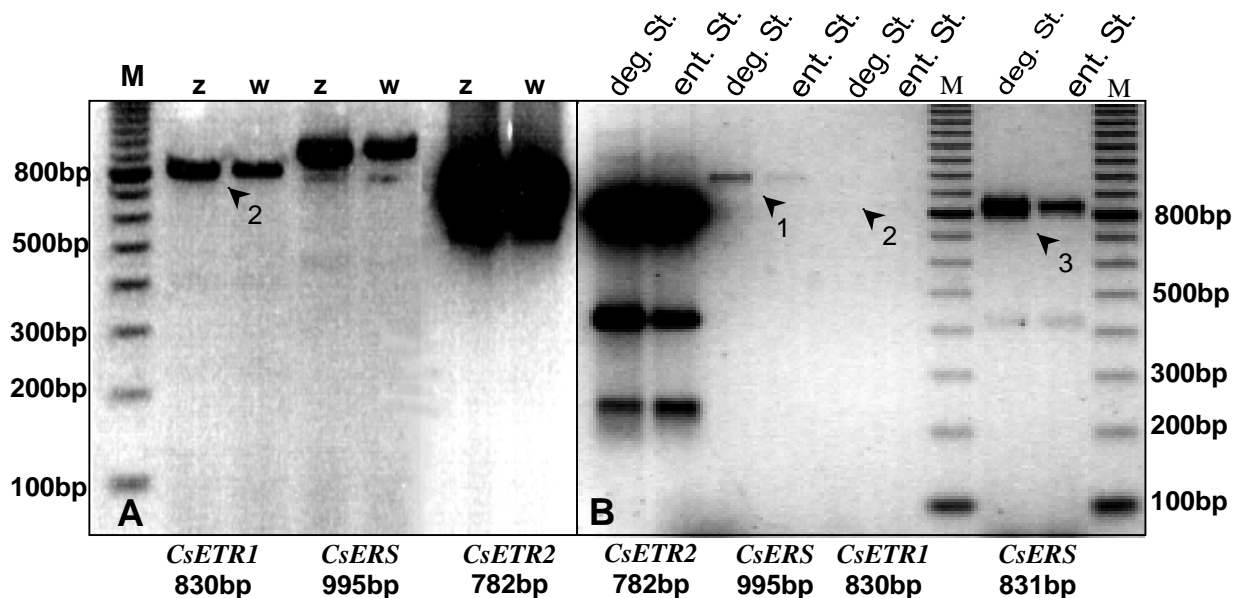


Abb. 4.11: Expressionsanalysen mittels RT-PCR mit Ethylenrezeptor spezifischen Primern *CsETR1,2*, *CsETR2,3*, *CsERS1* und *CsERS2* (Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.3).

A: RNA aus zwittrigen und weiblichen Knospen.

B: RNA aus degenerierten Stamina (deg. St.) (weibliche Knospen) und entwickelten Stamina (ent. St.) (zwittrige Knospen) (Primer *CsERS1* mit 995bp und Primer *CsERS2* mit 831bp) (siehe Abb. 4.3 in Kapitel 4.2.2.5).

Pfeil 1 und 3: stärkere Expression des Gens *CsERS* in degenerierten Stamina der weiblichen Blüte.

Pfeil 2: Expression des Gens *CsETR1* in den gesamten weiblichen und hermaphroditischen Knospen, jedoch keine Expression in den degenerierten oder entwickelten Stamina.

Für das Gen *CsETR2* konnte zwischen den Blütentypen kein Expressionsunterschied nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich, dass das Gen *CsETR2* sowohl in den weiblichen als auch in hermaphroditischen Knospen im Vergleich zu den Genen *CsETR1* und *CsERS* stärker exprimiert wird (siehe Abb. 4.11 A und B).

4.3.2.2 Molekulare Charakterisierung von Genen der Ethylensignaltransduktion bei gynözischen und hermaphroditischen Geschlechtstypen

4.3.2.2.1 Kopplungsanalysen mit unterschiedlichen Genen der Ethylensignaltransduktion mit dem *M/m* Gen

Da zum Beginn der Arbeit lediglich Gene der Ethylensignalkette bei *Arabidopsis* kloniert und molekulargenetisch charakterisiert waren, wurden zunächst mittels Amplifikation dieser Gene aus *Arabidopsis* heterologe Sonden hergestellt. Diese Sonden wurden anschließend bei Hybridisierungen mit restringierter genomischer DNA von gynözischen und hermaphroditischen Linien eingesetzt.

In Tab. 4.12 sind die 14 eingesetzten Sonden von verschiedenen Genen der Ethylensignaltransduktion (*Arabidopsis thaliana* = *at*) dargestellt. Die Sonden *at-ctr1*, *at-eil1*, *at-erf1* bis 3 und *at-erebp* zeigten ein auswertbares Hybridisierungsmuster.

Mit diesen 6 eingesetzten *A.t.*-Sonden konnte jedoch kein Unterschied zwischen den hermaphroditischen und gynözischen Linien im Hybridisierungsmuster nachgewiesen werden (Beispiele für Hybridisierungsmuster siehe Abb. 4.12 und 4.13).

Aufgrund von Homologiestudien zwischen den zu untersuchenden Genen der Ethylensignaltransduktion bei verschiedenen Pflanzenarten (siehe Anhang 7.7.1; Tab. 7.28) gelang es, im Verlauf der vorliegenden Arbeit konservierte Bereiche der zu untersuchenden Gene bei *C. sativus* zu amplifizieren und zu isolieren. Mit Hilfe dieser für *C. sativus* spezifischen Sonden der Ethylensignalkettengene wurden erneut Hybridisierungen mit restringierter gesamt DNA von gynözischen und hermaphroditischen Linien durchgeführt.

Die Sonden der erstmals in der vorliegenden Arbeit isolierten Teilsequenzen der Gene *CsCTR1*, *CsEIN3*, *CsEIL1*, *CsEIL2*, *CsERF1*, *CsERF2* und *CsEREBP* mit ihrer Größe und dem Hybridisierungsergebnis werden in Tab. 4.12 dargestellt.

Es zeigte sich bei allen eingesetzten Sonden ein auszuwertendes Hybridisierungsmuster, das jedoch keinen Unterschied zwischen den gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen ergab (siehe Abb. 4.12 und 4.13).

In Abb. 4.12 A und B und 4.13 A und B werden die Hybridisierungsmuster von Sonden der Gene *CTR1* und *EIL1* aus *Arabidopsis* (A) und aus *C. sativus* (B) miteinander verglichen. Dabei zeigten sich bei den Sonden *ctr1* aus *Arabidopsis* und *cs-ctr1* aus *C. sativus* ein zum Teil unterschiedliches Hybridisierungsmuster (vgl. Abb. 4.12 A und B und siehe Pfeil 2). Einige Hybridisierungsbanden dieser Sonden (*ctr1* und *cs-ctr1*) waren jedoch identisch (vgl. Abb. 4.12 A und B; siehe Pfeil 1).

Tab. 4.12: Hybridisierung mit heterologen (*Arabidopsis thaliana*) und homologen (*Cucumis sativus*) Sonden von Genen der Ethylensignaltransduktion und restringierter genomischer DNA von gynözischen und hermaphroditischen Linien.

Name ^s der Sonde	Größe der Sonde	Hybridisierung nach Restriktion ^y mit <i>DraI</i> , <i>HindIII</i> <i>EcoRI</i> und <i>V</i> , <i>MspI</i> und <i>XbaI</i>	Hybridisierung nach Restriktion mit ^z <i>BclI</i> , <i>Hin6I</i> , <i>MspI</i> , <i>MvaI</i> , <i>TaqI</i> , <i>HinfI</i> , <i>RsaI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>MboI</i>
<i>at-ctr1</i>	899bp ^t	+++ [*]	+++ ^{*v}
<i>cs-ctr1</i>	220bp ^{xu}	++++ [*]	++++ ^{*v}
<i>at-ein2</i>	1168bp ^t	-	
<i>at-ein3</i>	897bp ^t	-	
<i>cs-ein3</i>	343bp ^{xu}	++++ [*]	+++ [*]
<i>at-erf</i>	348bp ^t	-	
<i>at-eil1</i>	556bp ^t	+++ [*]	++++ ^{*w}
<i>cs-eil1</i>	371bp ^{xu}	++++ [*]	+++ ^{*w}
<i>at-eil2</i>	878bp ^t	-	
<i>cs-eil2</i>	542bp ^{xu}	+++ [*]	++++ [*]
<i>at-eil3</i>	699bp ^t	-	
<i>at-erf1</i>	490bp ^t	+ [*]	++ [*]
<i>cs-erf1</i>	147bp ^x	++ [*]	+++ [*]
<i>at-erf2</i>	423bp ^t	+++ [*]	+++ [*]
<i>at-erf3</i>	550bp ^t	+++ [*]	++ [*]
<i>at-erf4</i>	549bp ^t	-	
<i>cs-erf2</i>	92bp ^x	+++ [*]	++ [*]
<i>at-erf5</i>	895bp ^t	-	
<i>at-erf6</i>	623bp ^t	-	
<i>at-erebp</i>	160bp ^t	++ [*]	+++ [*]
<i>cs-erebp</i>	73bp ^x	++ [*]	++ [*]

^s: Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.2; At steht für *Arabidopsis thaliana*; Cs steht für *Cucumis sativus*

^t: DNA Fragmente wurden direkt als Sonde verwendet

^u: cDNA mittels RT-PCR

^v: Hybridisierungsmuster siehe Abb. 4.12

^w: Hybridisierungsmuster siehe Abb. 4.13

^x: Die DNA Fragmente wurden einkloniert und sequenziert (Sequenzen der konservativen cDNA-Abschnitte siehe Abb. 4.16 in Kapitel 4.3.2.2.2 (*CsERF2*) und Abb. 7.10 bis Abb. 7.22 in Anhang 7.7.1

^y: genomische DNA von gynözischen (*MM AcrAcr* und *Mm AcrAcr*) und hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Linien aus den genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD

^z: genomische DNA von gynözischen (*MM AcrAcr*) und hermaphroditischen (*mmAcrAcr*) Linien aus den genetischen Hintergrund WrD

^{*}: Hybridisierungsintensität (++++= klar erkennbares Hybridisierungsmuster bis += schwaches Bandenmuster; - keine Hybridisierungsbanden zu erkennen).

Im Gegensatz zu den in Abb. 4.12 A und B dargestellten Hybridisierungsmustern zeigten sich bei dem Einsatz der Sonden *eil1* aus *Arabidopsis* und *cs-eil1* aus *C. sativus* nur wenige Unterschiede (vgl. Abb. 4.13 A und B und siehe Pfeil 2). Diese identischen bzw. abweichenden Hybridisierungsmuster konnten durch eine Sequenzierung und einen anschließenden Homologievergleich der Ethylensignaltransduktionsgene von *Arabidopsis* bzw. von *C. sativus* erklärt werden (siehe Kapitel 4.3.2.2.2).

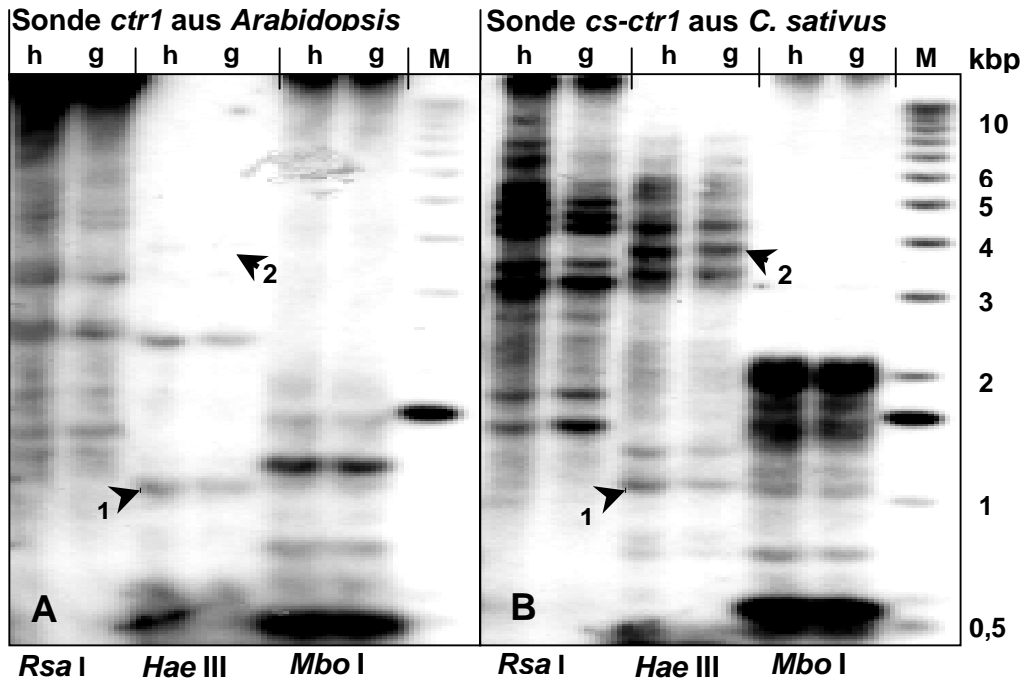


Abb. 4.12: Hybridisierungsmuster von hermaphroditischen (h) und gynözischen (g) Pflanzen des genetischen Hintergrundes WrD nach Restriktion mit *Rsa*I, *Hae*III und *Mbo*I und Hybridisierung mit der Sonde *ctr1* aus *Arabidopsis* (A) und *cs-ctr1* aus *Cucumis sativus* (B); Pfeil 1 = Beispiel eines identischen Hybridisierungssignals; Pfeil 2 = Beispiel eines unterschiedlichen Hybridisierungssignals.

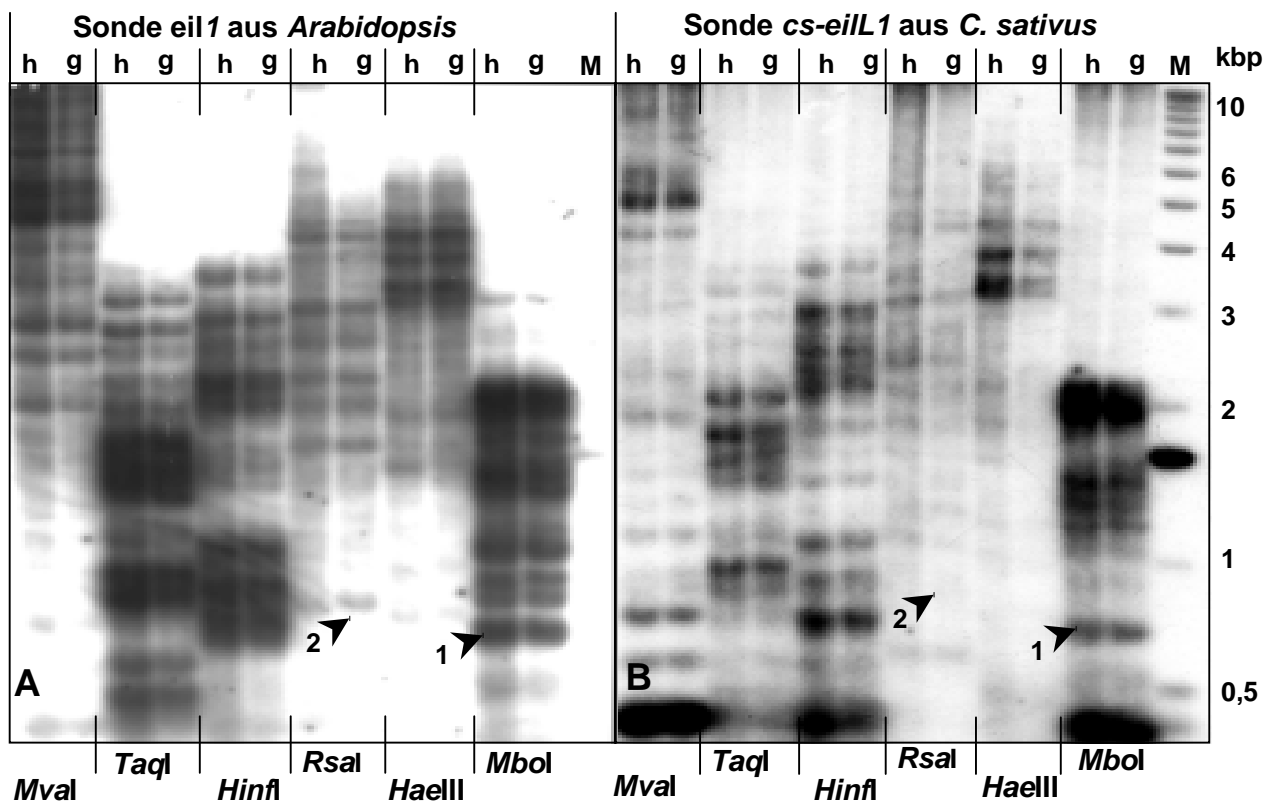


Abb. 4.13: Hybridisierungsmuster von hermaphroditischen (h) und gynözischen (g) Pflanzen nach Restriktion mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Hybridisierung mit den Sonden *eil1* und *cs-eil1*. Pfeil 1 = Beispiel eines identischen Hybridisierungssignals; Pfeil 2 = Beispiel eines unterschiedlichen Hybridisierungssignals.

4.3.2.2.2 Sequenzvergleiche zwischen konservierten Bereiche von Genen der Ethylensignaltransduktion bei *Cucumis sativus* L. und *Arabidopsis thaliana*

Wie bereits berichtet, wurden zwischen den zu untersuchenden Genen der Ethylensignaltransduktion bei verschiedenen Pflanzenarten Homologiestudien durchgeführt (siehe Anhang 7.7.1; Tab. 7.28). Durch die Bestimmung der konservativen Sequenzbereiche der entsprechenden Gene erfolgte anschließend für die Amplifikation und Isolierung bei *C. sativus* die Konstruktion spezifischer Primer. Da insgesamt 7 verschiedenen Sequenzen untersucht wurden, können in diesem Kapitel lediglich Beispiele dargestellt werden. Alle weiteren Ergebnisse werden im Anhang 7.7.1 angegeben.

In Abb. 4.14 wird als Beispiel der konservative Bereich des Gens *AtERF4* von *Arabidopsis* mit dem konservierten Bereich des Gens *CsERF2* der Gurke verglichen. Bei diesem Vergleich zeigte sich ein Homologiegrad des konservierten Bereichs der Gene *AtERF4* und *CsERF2* der Nukleinsäuren von 72% (eben) und Aminosäuren von 97% (siehe auch Abb. 4.17).

```

AtERF4  AATAATGCCAAGGAGATTTCGTTACAGAGGCCGTTAGGAAGCGTCCTTGGGGCCGTTATGCC 111
CsERF2  -----TACAGAGGCCGTTAGGAAGCGTTCTTGGGGTAGGTACGCT 39
          *****
AtERF4  GCCGAGATCCGAGATCCGGGCAAGAAAACCCGCGTCTGGCTTGGCACTTTTCGATACGGCT 171
CsERF2  GCTGAGATCAGAGATCCTTGGAAAGAAAAGTAGGGTCTGGCTTGGCACTTTTCGA----- 92
          ** ***** ***** * ** ***** * *****

```

Abb. 4.14: Beispiel eines Sequenzvergleiches des konservativen Bereiches der Gene *AtERF4* von *Arabidopsis* und *CsERF2* von *C. sativus* (weitere Homologievergleiche siehe Anhang 7.7.1; Abb. 7.10 bis Abb. 7.22); Primerbindungssequenz grau hinterlegt.

In Tab. 4.13 sind zusammengefasst die Ergebnisse der Homologievergleiche zwischen den Ethylensignaltransduktionsgenen von *Arabidopsis* mit *C. sativus* dargestellt.

So zeigen die konservativen Bereiche der untersuchten Gene auf der Ebene der Nukleinsäuren einen Homologiegrad von durchschnittlich 77% (63% bis 100%). Die Homologie auf der Ebene der Aminosäuren war mit durchschnittlich 88% (66% bis zu 100%) erwartungsgemäß höher (siehe Tab. 4.14).

Die hohe Homologie (100%) zwischen *EIL1* von *Arabidopsis* und *CsEIL1* von *C. sativus* konnte bereits durch ein nahezu identisches Hybridisierungsmuster gezeigt werden (siehe Kapitel 4.3.2.2.1; Abb. 4.13). Dagegen zeigten die Gene *CTR1* aus *Arabidopsis* im Vergleich zu *CsCTR* aus *C. sativus* lediglich einen Homologiegrad von 79%. Auch dieses Ergebnis konnte bereits durch zum Teil unterschiedliche Hybridisierungsmuster der Sonden *ctr1* und *cs-ctr1* bestätigt werden (siehe Abb. 4.12 in Kapitel 4.3.2.2.1).

Tab. 4.13: Homologievergleich der konservierten Bereiche der Ethylensignaltransduktionsgene zwischen *Cucumis sativus* und *Arabidopsis thaliana*.

Gen Name ^y	Größe <i>Arabidopsis</i> ^x	Größe <i>C. sativus</i> ^x	Sequenzvergleich des konservierten Bereichs zwischen <i>Arabidopsis</i> und <i>C. sativus</i>	
			Aminosäurehomologie	Nukleinsäurehomologie
<i>CTR1</i>	220bp	220bp	93%	79%
<i>EIN3</i>	342bp	343bp	96%	75%
<i>EIL1</i>	371bp	371bp	100%	100%
<i>EIL2</i>	533bp	542bp	66%	63%
<i>ERF1</i>	147bp	144bp	83%	72%
<i>ERF2</i>	712bp	669bp	87%	72%
<i>EREBP1</i>	365bp	327bp	95%	79%

^x : Homologievergleich siehe Abb. 4.14 und Anhang 7.7.1; Abb. 7.10 bis Abb. 7.22)

^y : Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.2.

4.3.2.2.2 Sequenzvergleiche der konservierten Bereiche der Ethylensignaltransduktionsgene zwischen gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen

Da das Ziel dieser Arbeit darin bestand, das *M/m* Gen mit einem Gen der Ethylensignaltransduktion zu korrelieren, erfolgte die Amplifikation der Gene *CsCTR1*, *CsEIN3*, *CsEIL1*, *CsEIL2*, *CsERF1*, *CsERF2*, und *CsEREBP* bei gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen.

Durch eine anschließende Klonierung und Sequenzierung konnte ein Homologievergleich zwischen den konservierten Sequenzbereichen der Ethylensignaltransduktionsgene von gynözischen und hermaphroditischen Linien durchgeführt werden. In Abb. 4.15 wird als Beispiel ein entsprechender Homologievergleich zwischen dem *CsERF2* von einer gynözischen und einer hermaphroditischen Pflanze dargestellt. Dabei zeigte sich ein 'Single Nukelotid Polymorphismus' nach 22bp, der bei den gynözischen Pflanzen zu einer Aminosäureänderung von P (Prolin) zu S (Serin) führen würde, und folglich eine Funktionsänderung des Gens zur Folge haben könnte.

```

CsERF2 g -TACAGAGGCGTTAGGAAGCGTTCTTGGGGTAGGTACGCTGCTGAGATCAGAGATCCTTG 59
CsERF2 h TTACAGAGGCGTTAGGAAGCGTCTTGGGGTAGGTACGCTGCTGAGATCAGAGATCCTTG 60
*****
CsERF2 g GAAGAAAAGTGGGTCTGGCTTGGCACTTTTCGA 92
CsERF2 h GAAGAAAAGTGGGTCTGGCTTGGCACTTTTCG- 92
*****

```

Abb. 4.15: Beispiel eines Sequenzvergleichs des konservativen Bereichs des Gens *CsERF2* aus einer gynözischen (g) und einer hermaphroditischen (h) Pflanze (weitere Homologievergleiche siehe Anhang 7.8; Abb. 7.27 bis Abb. 7.28); Polymorphismus grau hinterlegt.

Weitere Untersuchungen konnten jedoch diesen SNP, der zu einer veränderten *BsaJI* Schnittstelle des Gens *CsERF2* bei gynözischen Linien führt, nicht bestätigen. So zeigte eine Restriktion mit dieser Restriktionsendonuklease keinen Unterschied zwischen den

gynözischen und hermaphroditischen Linien. Auch durch die Homologieanalysen weiterer Gene der Ethylensignaltransduktion von gynözischen und hermaphroditischen Linien konnte keine oder nicht zu bestätigende SNP's detektiert werden. In Tab. 4.14 werden alle bei *C. sativus* untersuchten Gene der Ethylensignaltransduktion mit dem Ergebnis des Homologievergleiches zwischen gynözischen und hermaphroditischen Linien dargestellt. Die zuvor durchgeführten Homologievergleiche auf der Nukleinsäureebene, die eine SNP' zeigten, werden im Anhang 7.8; Abb. 7.27 und Abb. 7.28 dargestellt.

Tab. 4.14: Sequenzanalysen konservativer Bereiche der Ethylensignaltransduktionsgene bei gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen des genetischen Hintergrundes WrD.

Gen Name	Größe ^x	Sequenzvergleich des konservativen Bereichs			
		Position des SNPs ^x	detektierende Endonuklease		Korrelation mit dem <i>M/m</i> Gen
			Name	Schnittsequenz	
<i>CsCTR1</i>	220bp	kein Unterschied	-	-	-
<i>CsEIN3</i>	343bp	kein Unterschied	-	-	-
<i>CsEIL1</i>	371bp	220bp	<i>Bst4CI</i>	5' ACN↓GT 3'	nein [*]
<i>CsEIL2</i>	542bp	146bp	<i>BseGI</i>	5' C↓TAG 3'	nein [*]
<i>CsERF1</i>	147bp	kein Unterschied	-	-	-
<i>CsERF2</i>	92bp	22bp	<i>BsaJI</i>	5' C↓CNNGG 3'	nein [*]
<i>CsEREBP1</i>	73bp	kein Unterschied	-	-	-

^x: SNP konnte nicht bestätigt werden

^y: Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.2; Cs steht für *Cucumis sativus*

^{*}: Homologievergleich zwischen hermaphroditischen und gynözischen Linien siehe Abb. 4.15 und Anhang 7.8; Abb. 7.27 und Abb. 7.28.

4.3.2.2.3 Analyse der 5' und 3' cDNA Enden der Ethylensignaltransduktionsgene

Wie bereits erörtert wurde, konnten zwischen den konservativen Bereichen der Ethylensignaltransduktionsgene der gynözischen und hermaphroditischen Linien keine Unterschiede nachgewiesen werden. Zur weiteren Analyse der entsprechenden Gene wurde daher versucht, mittels einer 5'/3' RACE (**R**apid **A**mplifikation of **c**DNA- **E**nds) die gesamte mRNA Sequenz der entsprechenden Gene zu isolieren (Beispiel Amplifikation siehe Abb. 4.18). Ausgehend von dem bekannten konservierten Bereich (Ausgangssequenzen siehe Anhang 7.7.1; Abb. 7.10 bis Abb. 7.22 und Abb. 4.14) gelang es für das Gen *CsERF2* sowohl das 3' Ende als auch das 5' Ende zu amplifizieren und zu sequenzieren.

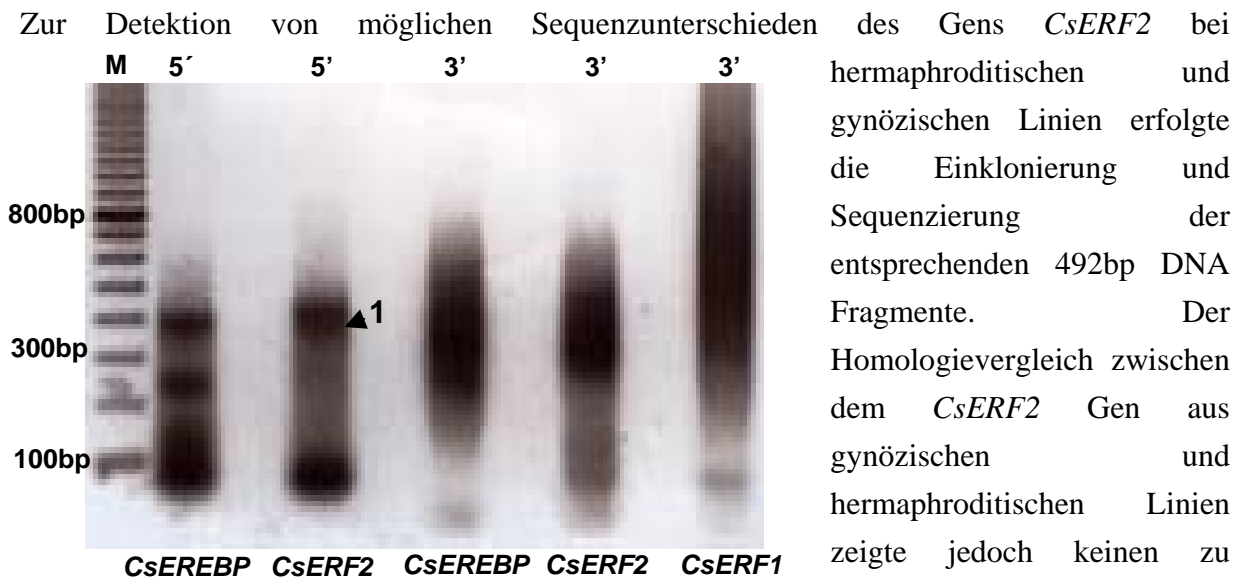


Abb. 4.18: Beispiel mittels 5'/3' RACE durchgeführte letzte Amplifikation (Primer sP₂ bzw. asP₃) der Gene *CsETR1*, *CsETR2* und *CsEREBP*, (Pfeil 1: 5'Endes des Gens *CsERF2*, Sequenz siehe Abb. 4.16 und 4.17).

Neben den hier dargestellten Ergebnissen konnte außerdem das 5'Ende des Gens *CsEREBP* isoliert und sequenziert werden (siehe Anhang 7.7.1; Abb.7.21 und Abb. 7.22).

Durch den Einsatz von nur einem spezifischen Primer erfolgt eine relativ unspezifische Amplifikation (siehe Abb. 4.18). Der dadurch entstehende DNA-Hintergrund führte dazu, dass die entsprechenden Fragmente nicht eindeutig erkannt und aus dem Agarosegel eluiert werden konnten. Aufgrund dieser Problematik konnten alle weiteren mittels 5' /3' RACE amplifizierten Fragmente der Gene *CsCTR1*, *CsEIN3*, *CsEIL1* und *CsERF1* durch Homologiestudien in der NCBI Datenbank nicht eindeutig den jeweiligen Genen zugeordnet werden. Folglich muß vermutet werden, dass es sich bei diesen Fragmenten um unspezifische DNA Fragmente handelte (Sequenzen nicht dargestellt).

4.3.2.2.4 Expressionsanalysen der Ethylensignaltransduktionsgene mit spezifischem Gewebe der weiblichen und zwittrigen Blüten

Neben der untersuchten Funktionsänderung der Ethylensignaltransduktionsgene durch eine Mutation in der Exonsequenz, könnte die lokale Unterdrückung der Staminaentwicklung in den weiblichen Blüten auch durch eine veränderte Transkription der Ethylensignaltransduktionsgene bedingt sein. Um diese Transkriptionsunterschiede der isolierten Gene (*CsCTR1*, *CsEIN3*, *CsEIL1*, *CsEIL2*, *CsERF1*, *CsERF2* und *CsEREBP*) zu untersuchen, wurde mit RNA aus unterschiedlichem Gewebe gynözischer und hermaphroditischer Pflanzen eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR durchgeführt.

In Abb. 4.20 werden die Ergebnisse der RT-PCR mit RNA aus der Wurzel junger Blätter und weiblichen Blütenknospen einer gynözischen Pflanze miteinander verglichen. Dabei zeigte

sich bei den Genen *CsERF2*, *CsCTR1*, *CsEIN3* und *CsEIL2* kein Expressionsunterschied. Dagegen konnte für das Gen *CsEREBP* im Vergleich zu den Blättern und den Wurzeln eine erhöhte Expression in den weiblichen Blüten nachgewiesen werden (siehe Abb.4. 19, Pfeil1).

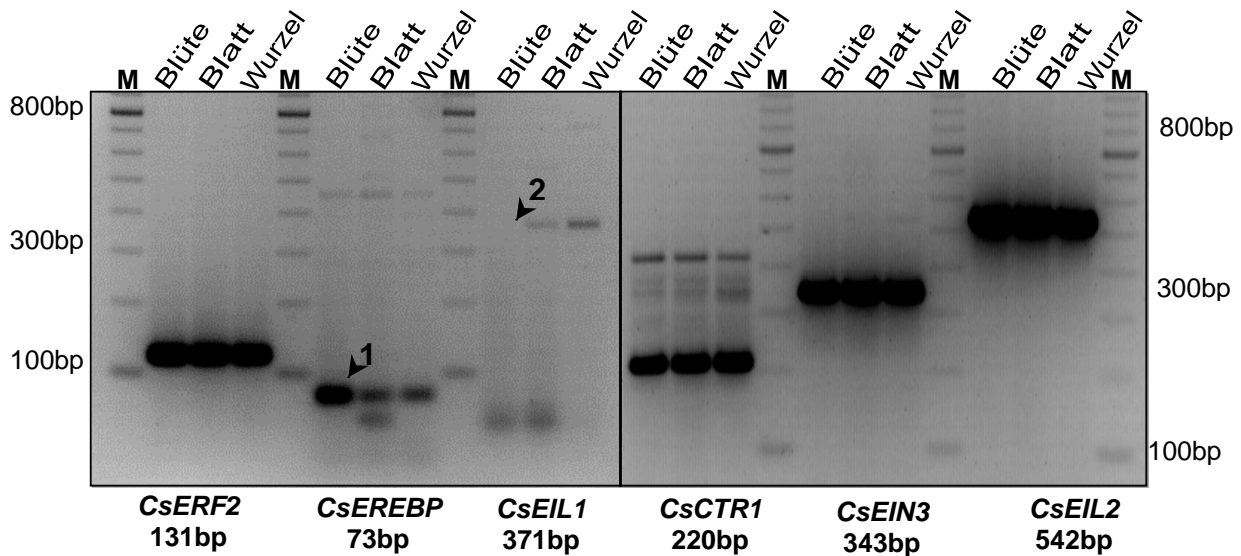


Abb. 4.19: Expression von Genen des Ethylensignaltransduktionswegs in unterschiedlichen Organen der gynözischen Genotypen.

Pfeil 1: Erhöhte Expression des Gens *CsEREBP* in weiblichen Blüten.

Pfeil 2: Keine Expression in weiblichen Blüten

Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.2; Cs steht für *Cucumis sativus*.

Die Expression des Gens *CsEIL1* konnte nur in Wurzeln und Blättern, jedoch nicht in den Blüten der untersuchten gynözischen Pflanzen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.19, Pfeil 2).

Da die Expression des *M/m* Gens höchstwahrscheinlich im dritten Wirtel der Blüten erfolgt (siehe auch Kapitel 2.2.4.3 und 2.1.2), wurde die Expression der Ethylensignaltransduktionsgene in den degenerierten Stamina und den entwickelten Stamina untersucht. Die Ergebnisse dieser RT-PCR (siehe Abb. 4.20) zeigen, dass die Gene *CsERF1*, *CsERBP*, *CsEIL2*, *CsEIN3* und *CsCTR1* sowohl in degenerierten Stamina der weiblichen Knospen als auch in den entwickelten Stamina der zwittrigen Knospen expremiert werden.

Es konnte jedoch keine Transkription des Gens *CsERF2* in dem spezifischen Gewebe des dritten Wirtels (degenerierte bzw. entwickelte Stamina) nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.20, Pfeil 2). Da die zuvor mit genomischer DNA durchgeführte PCR mit dem Primerpaar *CsERF2.2* (außerhalb des konservativen Bereichs) die Amplifikation eines 439bp Fragmentes zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass diese Sequenz im Genom der Gurke existiert. Außerdem konnte eine Transkription des Gens *CsERF2* bei der Verwendung von RNA aus der gesamten gynözischen Knospen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.19), so dass vermutet werden kann, dass das Gen *CsERF2* in der Wirteln 1, 2 oder 4 expremiert wird.

Für das Gen *CsEIL1* konnte, wie bereits die Expressionsanalysen in den Knospen zeigten (Abb. 4.19), keine Expression nachgewiesen werden. So erfolgte bei der RT-PCR lediglich einige unspezifische Amplifikation, jedoch keine Expression des Gens von 371bp (siehe Abb. 4.20, Pfeil 1).

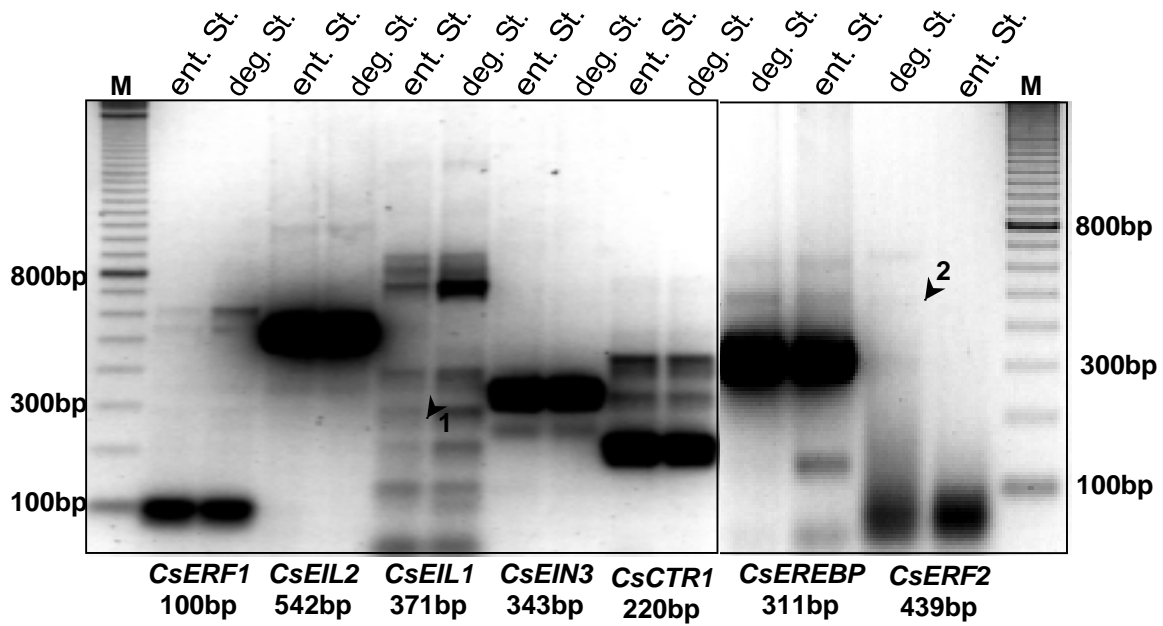


Abb. 4.20: Expression von Genen des Ethylensignaltransduktionswegs in degenerierten Stamina (deg. St.) (weibliche Knospen) mit entwickelten Stamina (ent. St.) (hermaphroditische Knospen) (siehe Abb. 4.4 in Kapitel 4.2.1.1).

Pfeil 1 : keine Expression des Gens *CsEIL1* (Amplifikation von unspezifischen Banden)

Pfeil 2 : keine Expression des Gens *CsERF2*.

4.4 Diskussion

4.4.1 Das Pflanzenmaterial

Da die grundlegenden Vor- bzw. Nachteile des Pflanzenmaterials bereits in Kapitel 2.4.1 ausführlich diskutiert wurden, wird in diesem Kapitel die Verwendung des Pflanzenmaterials in Bezug auf die molekulare Charakterisierung des *M/m* Gens diskutiert.

Die Ausprägung des *M/m* Gens ist vollständig dominant und kann durch Umwelteinflüsse modifiziert, jedoch nicht revidiert werden. Daher ist die Aufspaltung des *M/m* Gens im Gegensatz zu der Aufspaltung des *Acr/acr* Gens in der F₂ Generation immer eindeutig (vgl. mit Kapitel 3.4.1), so dass eine einfache Selektion der entsprechenden hermaphroditischen Genotypen in den Nachkommenschaften möglich ist (siehe Rückkreuzungsprogramm Abb. 2.7 in Kapitel 2.2.1).

Die Isogenität der verwendeten gynözischen und hermaphroditischen Linien, die bereits in Kapitel 2 und 3 erläutert und diskutiert wurde, war Voraussetzung für die Durchführung der RT-PCR Analysen, insbesondere für die DDRT-PCR (weiteres siehe Kapitel 4.2.2 Methodische Ansätze).

Aufgrund der Isogenität des Pflanzenmaterials und der Verwendung von drei verschiedenen genetischen Hintergründen (WrD, ED und ECD) konnten bei den Korrelationsstudien zwischen den Kandidatengen und dem *M/m* Gen alle nicht eng mit dem *M/m* Locus gekoppelten Gene eliminiert werden. Damit war es möglich, mit dem *M/m* Gen korrelierende Polymorphismen, die in einem genetischen Hintergrund detektiert wurden, mit Hilfe von zwei weiteren genetischen Hintergründen zu bestätigen oder zu widerlegen. Folglich konnte auf eine Bestätigung einer engen Kopplung der Kandidaten-Gene mit dem *M/m* Locus mittels spaltender Nachkommenschaften verzichtet werden konnte.

Die Expression des *M/m* Gens ist wahrscheinlich sehr lokal auf den dritten Wirtel beschränkt, so dass bei den Transkriptionsanalysen insbesondere dieses Blütengewebe (der dritte Wirtel) der weiblichen und zwittrigen Blüten miteinander verglichen wurde. Damit konnten alle Kandidaten Gene, die in dem dritten Wirtel der weiblichen Blüten (degenerierte Stamina) nicht expremiert werden, für zukünftige Untersuchungen ausgeschlossen werden.

4.4.2 Die Methodischen Ansätze

Zur molekularen Charakterisierung des *M/m* Gens wurden in der vorliegenden Arbeit zwei sich ergänzende Strategien durchgeführt. Zum einen wurde versucht, mittels DDRT-PCR unbekannte Gensequenzen zu isolieren, zum anderen erfolgte ein Kandidatengenansatz mit Hilfe physiologischer Funktionsstudien (Kapitel 2.5.3: Neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise des männlichkeitsinhibierenden Faktors, das *M/m* Gen). Bei diesem

methodischen Ansatz wurden die Sequenzinformationen von bereits bekannten und physiologisch charakterisierten Genen anderer Pflanzenarten verwendet.

Die DDRT-PCR begründet sich auf der Annahme, dass jedes mRNA Molekül durch reverse Transkription und anschließende Amplifikation darstellbar ist (LIANG und PARDEE 1992). In der vorliegenden Arbeit basiert diese Methode daher auf einem Vergleich der Transkriptionsmuster von weiblichen und zwittrigen Blüten. Mit Hilfe der DDRT-PCR können vor allem wichtige Gene bei Differenzierungsprozessen; z. B. Kallusinduktion und Regeneration, aber auch Reaktionen auf wechselnde Umweltbedingungen, erfasst werden.

Um eine möglichst geringe Anzahl polymorpher cDNA-Banden zu erhalten, sollten Pflanzen miteinander verglichen werden, die sich möglichst nur in der zu untersuchenden Merkmalsausprägung unterscheiden. Dies kann z. B. durch die Verwendung von Klonteilen, die bei unterschiedlichen Umweltbedingungen eine differentielle Genexpression aufweisen, erreicht werden. So konnten für die grundlegenden Arbeiten zur Isolierung des temperatursensitiven Restorergens der CMS1 (cytoplasmatische männliche Sterilität) bei *Allium schoenoprasum* L. bei unterschiedlichen Temperaturen kultivierte Klonteile eingesetzt werden (ENGELKE 1999). Außerdem können zur Untersuchung eines umweltstabilen Merkmals mehrere Pflanzen mit dem zu charakterisierenden Genotyp zu einer Probe zusammengefasst werden. Diese "bulk-segregant"-Analyse nach MICHELMORE et al. (1991), die für die Detektion von DNA Markern genutzt wird, ist jedoch bei der DDRT-PCR nur mit Einschränkungen anzuwenden. So zeigten sich bei den Arbeiten zur Isolierung des *Wi/wi*-Gens (GMS, genisch männliche Sterilität) bei *Allium schoenoprasum* L. über 1400 polymorphe Banden (DEWAL 2001).

Eine weitere Möglichkeit ist die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kommende Verwendung von nahe isogenen Linien. So wurden nahe isogene gynözische (*MM AcrAcr*) und hermaphroditische (*mm AcrAcr*) Linien des genetischen Hintergrundes WrD mit einer Isogenität von über 99% eingesetzt.

Um die DDRT-PCR effektiv einsetzen zu können, muss der Expressionsort des zu isolierenden Gens bekannt sein. Aufgrund der durchgeführten Pfropfungsversuche zwischen hermaphroditischen und gynözischen Linien konnte der Expressionsort in der Sprossspitze lokalisiert werden (siehe Kapitel 2.3.2 und 2.4.3), so dass die eingesetzte RNA aus jungen weiblichen und zwittrigen Knospen isoliert wurde.

Der wichtigste methodische Vorteil der DDRT-PCR besteht darin, dass keine Informationen über die Funktion des gesuchten Gens benötigt werden, und folglich unbekannte Gene isoliert und analysiert werden können. Damit stellt diese Methode in der vorliegenden Arbeit eine ideale Ergänzung zu dem Kandidatengenansatz (s. u.) dar.

Aufgrund der durchgeführten PCR ist es möglich, auch schwach exprimierte Gene zu erfassen. Um möglichst alle transkribierten Gene der Blütenknospen zu detektieren, erfolgte eine Optimierung der PCR-Bedingungen mittels "Taguchi-Methode" nach COBB und CLARKSON (1994) (näheres siehe ENGELKE 1999). Bei dieser Methode wurde die PCR so optimiert, dass eine möglichst hohe Anzahl von amplifizierten Fragmenten mit einer Größe

von 100-1000bp bei der anschließenden Silberfärbung detektiert wurde. Die damit gewählten PCR-Bedingungen führten jedoch durch die niedrige annealing Temperatur, die hohe MgCl₂ Konzentration und den Einsatz der Dekamer upstream-Primern (U Primer) zu unstringenten Bedingungen. Damit waren die Ergebnisse nicht oder nur schlecht reproduzierbar.

Ein weiterer Nachteil der Methode besteht darin, dass lediglich Expressionsunterschiede oder im Bandenmuster gut zu erkennende Größenunterschiede (z.B. Deletionsmutationen) nachgewiesen werden können.

Damit ist mittels der DDRT-PCR keine Analyse einer funktionellen Veränderung des zu isolierenden Gens, die zum Beispiel auf *Single Nucleotide Polymorphismen* im Exon der Gensequenz beruhen kann, möglich. Da jedoch auch diese funktionellen Veränderungen bei dem *M/m* Gen zu vermuten sind, wurde in der vorliegenden Arbeit mittels eines Kandidatengenansatzes nach diesen Sequenzpolymorphismen gesucht.

Der größte Vorteil des Kandidatengenansatzes besteht darin, dass eine sehr spezifische Analyse der entsprechenden Gene möglich ist. Weiterhin stehen, wenn ein Kandidatengen mit dem zu charakterisierenden Merkmal korreliert werden kann, über die Funktion des entsprechenden Gens bereits Informationen von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung. Dieses Wissen kann für die weitere Aufklärung der physiologischen Interaktion des zu isolierenden Gens von entscheidender Bedeutung sein. Voraussetzung für die Analyse von Kandidatengen sind jedoch weitreichende Funktionsanalysen des zu isolierenden Gens, so dass die Anzahl der in Frage kommenden Kandidatengene überschaubar bleibt. Weiterhin muß die vermutete physiologische Funktion des Kandidatengens bei mehreren anderen Pflanzenarten erforscht worden sein. Da eine Isolierung der entsprechenden Gene in dem zu untersuchenden Organismus mittels eines Homologievergleichs der Kandidatengene erfolgt, werden die Sequenzen des entsprechenden Kandidatengens von mindestens zwei Pflanzenarten benötigt. Aus diesem Grund existiert bei der Durchführung dieser Methode eine Abhängigkeit von den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen.

Die physiologische Funktion des *M/m* Gens wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit umfassend untersucht, so dass in Verbindung mit den Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen (YIN und QUINN 1995; SARAF-LEVY et al. 2000, KATER et al. 2001, YAMASAKI et al. 2001) eine Hypothese zur Funktion des *M/m* Gens entwickelt werden konnte. Diese bereits in Kapitel 2.4.3 und 2.4.4 ausführlich diskutierte Funktion des dominanten *M* Gens kann als eine lokale Erhöhung der Ethylensensitivität des dritten Wirtels beschrieben werden. Diese führt zu einer Unterdrückung der Staminaentwicklung innerhalb der damit entstehenden weiblichen Blüte.

Da die Ethylenaktivität eine entscheidende Rolle bei vielen Entwicklungsprozessen der Pflanze spielt (z. B. Seneszenzprozesse), erfolgte in den letzten Jahren eine intensive Erforschung der molekularbiologischen Ethylenwirkung (siehe Kapitel 4.1.2). Daher standen viele Ergebnisse zur Selektion verschiedener Kandidatengene bei der vorliegenden Arbeit zur Verfügung.

4.4.3 Nachweis unterschiedlich exprimierter mRNA's

Der Vergleich der amplifizierten Bandenmuster zeigte aufgrund der verwendeten nahe isogenen gynözischen und hermaphroditischen Linien eine hohe Homogenität, so dass mit nur 39 polymorphen Fragmenten der gynözischen Linie eine gut zu analysierende Anzahl von cDNA-Fragmenten detektiert wurde. Von den 39 aus dem Polyacrylamidgel eluierten polymorphen cDNA Fragmenten konnten 25 in der erwarteten und 14 in einer geringeren Größe reamplifiziert werden. Diese Reamplifikation von zu kleinen Fragmenten kann aufgrund unstringenter PCR Bedingungen entstehen (siehe Kapitel 4.1.1), durch die sich der U Primer (upstream-Primern) an einer zum 3'Ende näheren Sequenzabschnitt anlagern kann.

Die anschließenden molekulargenetische Charakterisierung der cDNA-Fragmente mittels Southern-Hybridisierungen, Sequenzierungen und Expressionsanalysen wurden darauf ausgerichtet, ein unbekanntes Gen zu detektieren, dass das *M/m* Gen darstellt.

Diese Korrelationstudien zwischen den polymorphen Fragmenten und dem *M/m* Gen dienten daher nicht als klassische Kopplungsanalysen, bei denen durch die Verwendung spaltender Nachkommenschaften das Ziel der Kartierung eines Gens im Vordergrund steht.

Obwohl eine verhältnismäßig große Anzahl verschiedener Restriktionsendonukleasen (14 x 39 Enzym/Sonden Kombinationen) bei gynözischen und hermaphroditischen Linien getestet wurde, konnten keine polymorphen Bandenmuster detektiert werden, so dass eine Korrelationsstudie zwischen den cDNA-Fragmenten und dem *M/m* Gen nicht durchgeführt werden konnte. Jedoch besteht theoretisch weiterhin die Möglichkeit, durch den Einsatz weiterer Restriktionsendonukleasen zu einer Korrelation mit dem *M/m* Gen zu gelangen.

Bei den Southern-Hybridisierungen zeigten einige Fragmente, obwohl sie mit unterschiedlichen Primerkombinationen amplifiziert wurden, ein identisches Hybridisierungsmuster. Nach der Sequenzierung der entsprechenden Sonden, konnte der Nachweis erbracht werden, dass alle eingesetzten Sonden, die zu einem identischen Hybridisierungsmuster führten, zueinander homolog sind (siehe Anhang 7.6; Abb. 7.5 bis Abb.7.8 und Tab. 4.10 in Kapitel 4.3.1.2).

Da die DDRT-PCR entwickelt wurde, um eine möglichst große Anzahl verschiedener cDNA-Fragmente zu detektieren, konnte nicht erwartet werden, dass ein Gen bzw. ein cDNA-Fragment insgesamt 8 mal amplifiziert wird. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass die polymorphe Expression eines Gens in den weiblichen Knospen durch 8 verschiedene RT-PCR Reaktionen nachgewiesen werden konnte. Durch die Sequenzvergleiche in der NCBI Datenbank konnte jedoch keine signifikante Homologie zu einem bereits bekannten Gen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.3.1.2). Auch die anschließend durchgeführte spezifische Expressionsanalyse dieses bei der DDRT-PCR 8 mal detektierten cDNA-Fragmentes in weiblichen und hermaphroditischen Knospen, zeigte keine differentielle Expression (siehe Kapitel Abb. 4.9 in Kapitel 4.3.1.3). Damit konnte die bei der DDRT-PCR nachgewiesene differentielle Expression nicht bestätigt werden.

Die Expressionsanalysen einiger weiterer cDNA-Fragmente mittels spezifischer Primer zeigten bei der RT-PCR keine differentielle Expression in den weiblichen und zwittrigen Knospen, so dass die Ergebnisse der DDRT-PCR nicht bestätigt werden konnten (Kapitel 4.3.1.3, Abb. 4.9). Die spezifische RT-PCR stellt jedoch im Gegensatz zur unspezifischen Reaktion der DDRT-PCR eine sehr sensitive Methode dar, mit der bereits sehr kleine cDNA Mengen amplifiziert werden. Aufgrund dieser hohen Sensitivität der spezifischen RT-PCR wurden wahrscheinlich auch geringe Transkriptmengen der zu analysierenden Gene amplifiziert, so dass eventuell vorhandene Expressionsunterschiede zwischen den weiblichen und hermaphroditischen Knospen mit dieser Methode unter Umständen nicht nachzuweisen sind. Da mit Hilfe der RT-PCR also nicht der reale Transkriptionsgehalt des analysierten Gens dargestellt werden kann, müssen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen mit zukünftigen Northern-Hybridisierungen bestätigt werden. Auch die differentielle Expression der noch zu untersuchenden 11 cDNA-Fragmente (s.u.) sollte folglich nicht mit der RT-PCR Methode untersucht werden, sondern mit der besser geeigneten Northern-Hybridisierung.

Die Sequenzvergleiche aller 39 cDNA-Fragmente mit bereits isolierten Genen anderer Organismen in der NCBI Datenbank zeigten keine signifikante Homologie zu einem bekannten pflanzlichen Gen. Die Amplifikation von insgesamt sechs cDNA-Fragmenten mit einer signifikanten Homologie von 129 bis 185bp zu nicht pflanzlichen Genen ist wahrscheinlich auf Kontamination zurückzuführen. Durch die Verwendung von RNA aus nicht sterilem Pflanzenmaterial wurden möglicherweise aufgrund der unspezifischen DDRT-PCR auch menschliche und bakterielle RNA- bzw. DNA- Kontaminationen amplifiziert. Dass es sich bei diesen cDNA-Fragmenten wahrscheinlich um Kontaminationen handelt, zeigen auch die Ergebnisse der Southern-Hybridisierungen, da 5 dieser cDNA-Fragmente kein Hybridisierungsmuster aufweisen.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen konnte die Anzahl der ursprünglichen 39 cDNA-Fragmente Schritt für Schritt verringert werden. So zeigten nur 29 Fragmente bei den Southern-Hybridisierungen ein Hybridisierungsmuster. Da einige cDNA-Fragmente aufgrund ihrer Homologie von einer identischen mRNA stammen, verringerte sich die Anzahl nochmals auf 19. Mit Hilfe der spezifischen Expressionsanalyse mit Primern von 8 cDNA-Fragmenten können zwei weitere Fragmente ausgeschlossen werden, da für diese die Expression nicht bestätigt werden konnte. Die restlichen 17 cDNA Fragmente sollten in zukünftigen Arbeiten mittels Northern-Hybridisierung (s. o.) auf ihre differentielle Expression in weiblichen und zwittrigen Blüten untersucht werden.

4.4.4 Isolierung und Charakterisierung von Genen des Ethylenperzeption und der Ethylensignaltransduktion

Die Analyse der Ethylenperzeption und deren Korrelation zum *M/m* Gen erfolgte durch eine molekulargenetische Charakterisierung der Ethylenrezeptoren mittels Southern-Hybridisierungen, Sequenz- und Expressionsanalysen. Da Southern-Hybridisierungen nur monomorphe Hybridisierungsmuster zeigten, konnte eine Korrelationsstudie zwischen den Genen *CsETR1*, *CsETR2* und *CsERS* und dem *M/m* Gen nicht durchgeführt werden.

Auch die von SARAF-LEVY et al. (2000) durchgeführte RFLP-Analysen mit *CsERS* homologen Sonden, konnten keine Polymorphismen zwischen gynözischen und hermaphroditischen Pflanzen nachweisen, so dass von der Arbeitsgruppe Korrelationsstudien mit Hilfe von SNP's des Gens *CsERS* durchgeführt worden sind. Diese Untersuchungen zeigten jedoch keine Kopplung zwischen dem Gen *CsERS* und dem *M/m* Gen, so dass das *M/m* Gen und der Ethylenrezeptor *CsERS* nicht identisch sein können (SARAF-LEVY et al. 2000).

Zur Analyse der Sensitivität der Ethylenrezeptoren *CsETR1*, *CsETR2* und *CsERS* erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Sequenzierung des N-Terminus dieser Gene (siehe auch Kapitel 4.1.2) bei gynözischen und hermaphroditischen Genotypen des genetischen Hintergrundes WrD. Der anschließende Homologievergleich zeigte jedoch keine Unterschiede dieses Sequenzabschnittes (siehe Abb. 4.10 in Kapitel 4.3.2.1). Folglich kann eine Sensitivitätsveränderung dieser Ethylenrezeptoren aufgrund einer Mutation innerhalb des für die Ethylenbindung kodierenden Sequenzbereiches ausgeschlossen werden.

Bei einer spezifischen Expressionsanalyse der Gene *CsETR1*, *CsETR2* und *CsERS* der gesamten weiblichen und zwittrigen Knospen konnte keine differentielle Expression nachgewiesen werden.

Da die Ergebnisse der physiologischen Studien der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 2.5.3) und anderer Arbeitsgruppen (KATER et al. 2001) zeigten, dass die Expression des dominanten *M/m* Gens lokal auf den dritten Wirtel der weiblichen Blüte beschränkt sein muss, wurden mit diesem Gewebebereich spezifische Expressionsanalysen der Gene *CsETR1*, *CsETR2* und *CsERS* durchgeführt. Bei diesen Analysen konnten keine Transkripte des Gens *CsETR1* nachgewiesen werden, so dass dieses Gen wahrscheinlich nicht mit der Funktion des *M/m* Gens in Verbindung gebracht werden kann. Während für das Gen *CsETR2* kein Expressionsunterschied nachgewiesen werden konnte, zeigte das Gen *CsERS* eine differentielle Expression (siehe Kapitel 4.3.2.1 Abb. 4.11B). Da von SARAF-LEVY et al. (2000) jedoch keine Kopplung zwischen dem *M/m* Locus und dem Gen *CsERS* nachgewiesen wurde (s.o.), könnte lediglich ein indirekter Einfluss des *M/m* Gen Produktes auf die Expression des Gens *CsERS* vermutet werden. Mit Hilfe der verwendeten RT-PCR sind jedoch die genauen Transkriptmengen des untersuchenden Gewebes nur unzureichend darzustellen (weiteres siehe Kapitel 4.4.3). Folglich ist bei zukünftigen Arbeiten eine Bestätigung dieser Ergebnisse mittels einer Northern-Hybridisierung notwendig.

Durch vergleichende Expressionsstudien der Ethylenrezeptorgene bei gynözischen (*MM AcrAcr*) und monözischen (*MM acracr*) Pflanzen von YAMASAKI et al. (2000) konnte eine erhöhte Expression der Gene *CsETR2* und *CsERS* in der Sprossspitze der gynözischen Pflanzen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression der Gene *CsETR2* und *CsERS* durch die endogene Ethylenkonzentration reguliert werden könnte (YAMASAKI et al. 2000). Da bei andromonözischen Pflanzen im Gegensatz zu monözischen Pflanzen keine erhöhte Transkription von *CsETR2* und *CsERS* nach einer Ethephon Behandlung nachgewiesen wurde (YAMASAKI et al. 2001), könnte diese ethylenabhängige Expressionsregulation vom *M/m* Gen beeinflusst werden (YAMASAKI et al. 2001). Eine solche unterschiedliche ethylenabhängige Expression von Ethylenrezeptorgen konnte auch bei verschiedenen physiologischen Prozessen anderer Pflanzenarten nachgewiesen werden (LAWTON et al. 1994, CHEN und BLEECKER 1995, TIEMAN und KLEE 1999, SATO-NARA et al. 1999; zusammengefasst in MCGRANTH und ECKER 1998). Bei *Arabidopsis* konnte diese Expressionserhöhung durch Ethylen nur für die Gene *ETR2* und *ERS1* nachgewiesen werden (HUA und MEYEROWITZ 1998; zusammengefasst in BLEECKER 1999).

Da für die Untersuchungen von YAMASAKI et al. (2000 und 2001) jedoch RNA aus der gesamten Sprossspitze isoliert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Expressionunterschied für ein Gewebe außerhalb der Knospen (z.B. junge Blätter) nachgewiesen wurde.

Dass eine solche Expressionsanalyse mit verschiedenem Gewebe problematisch ist, zeigt der Nachweis einer differentiellen Expression der Ethylenrezeptorgene (*CsETR1* und *CsERS*) innerhalb der Blütenknospe (Abb. 4.11 des Kapitels 4.3.2). Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Expressionsanalysen verschiedener Ethylenrezeptorgene in Blütenorganen anderer Pflanzenarten. Diese zeigen je nach Blütenorgan und dessen Entwicklungsstadium ein typisches Expressionsmuster der Ethylenrezeptor-Gene (Tomate: LASHBROOK et al. 1998; *Pasiflora*: MITA et al. 2002; Nelke: TENHAVE und WOLTERING 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse folgerten LASHBROOK et al. (1998), dass wichtige Entwicklungsprozesse (z.B. Blütenseneszenz und Fruchtinduktion) über die Expression verschiedener Ethylenrezeptoren in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Blütenorgane reguliert werden könnten (LASHBROOK et al. 1998).

Ähnliche Prozesse können auch bei der Geschlechtsdetermination der Gurke vermutet werden. So zeigten die physiologischen Untersuchungen des Kapitels 2, dass es durch das Produkt des dominanten *M/m* Gens zu einer auf den dritten Wirtel der gynözischen Blüte beschränkten Erhöhung der Ethylensensitivität kommt. Diese könnte durch eine erhöhte Expression eines Ethylenrezeptors hervorgerufen werden. Wenn das *M/m* Gen direkt für einen Ethylenrezeptor kodieren sollte, können von den isolierten Ethylenrezeptoren der Gurke bereits das Gen *CsETR1* (keine Expression im dritten Wirtel) und das Gen *CsERS* (keine Kopplung mit dem *M/m* Gen (SARAF-LEVY et al. (2000))) ausgeschlossen werden.

Folglich könnte das *M/m* Gen für das Gen *CsETR2* kodieren, so dass bei zukünftigen Arbeiten eine Transkriptionsanalyse dieses Gens in degenerierten und entwickelten Stamina mittels Northern-Hybridisierungen erfolgen sollte.

Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass bei der Gurke lediglich drei verschiedene Ethylenrezeptoren existieren. So konnten bei *Arabidopsis* neben den Ethylenrezeptoren *ETR1*, *ETR2* und *ERS* die zwei weitere Ethylenrezeptoren *EIN4* und *ERS2* isoliert werden (siehe Kapitel 4.1.2.1). Folglich sollte auch bei der Gurke versucht werden, weitere Ethylenrezeptoren zu isolieren und bezüglich der Geschlechtsausprägung zu analysieren.

Das Produkt des *M/m* Gens könnte jedoch auch die Expression eines Ethylenrezeptorgens regulieren, so dass die differentielle Expression des Gens *CsERS* in entwickelten und degenerierten Stamina zu erklären wäre (siehe 4.3.2.1 Abb. 4.11B).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die unterschiedliche Ethylensensitivität des dritten Wirtels der weiblichen und zwittrigen Blüten einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Ethylensignaltransduktion hat. Untersuchungen, die bei *Arabidopsis* durchgeführt wurden, zeigten, dass bei Mutationen der beteiligten Gene eine veränderte Ethylenreaktion zu beobachten ist (siehe Kapitel 4.1.2.2).

Um diese Gene im Zusammenhang mit der Funktion des *M/m* Gens zu analysieren, wurden sie in der vorliegenden Arbeit zunächst bei *Arabidopsis* amplifiziert und als Sonden bei Southern-Hybridisierungen mit gynöischen und hermaphroditischen Linien eingesetzt. Es zeigte sich jedoch kein polymorphes Hybridisierungsmuster, so dass keine Korrelationsstudien zwischen den Genen der Ethylensignaltransduktion von *Arabidopsis* und dem *M/m* Gen durchgeführt werden konnten. Zur genaueren Analyse der betreffenden Gene erfolgte nach einem Homologievergleich zwischen verschiedenen Pflanzenarten die Isolierung von sieben Teilsequenzen aus Genen der Ethylensignaltransduktion bei der Gurke.

Die Funktion des *M/m* Gens könnte zum einen durch eine dominante Mutation, die eine gewebespezifische Erhöhung der Ethylenreaktion zur Folge hat, erklärt werden. Zum anderen würde jedoch auch eine rezessive Mutationen, die zu einer gewebespezifischen Verringerung der Ethylenreaktion führt, die physiologische Wirkung des *M/m* Gens erklären. Mutationen mit diesem Charakter konnten jedoch bis heute bei keiner Pflanzenart nachgewiesen werden (zusammengefasst in MCGRATH und ECKER 1998; CHANG und SHOKEY 1999; HALL et al. 2000).

Dass Gene der Ethylensignalkette einen Einfluss auf die Entwicklung der reproduktiven Blütenorgane haben können, zeigen die Untersuchungsergebnisse bei *Arabidopsis* (KIEBER und ECKER 1993; 1994). So konnte bei der Mutation des Gens *CTR1* eine eingeschränkte Fertilität der Männlichkeit aufgrund einer Verzögerung der Stamina Entwicklung und eine frühere Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane nachgewiesen werden (KIEBER und ECKER 1994). Alle bis heute detektierten Mutationen des Gens *CTR1* zeigten jedoch keine

gewebespezifische Reaktion, sondern führen innerhalb der gesamten Pflanze zu unterschiedlichen physiologischen Reaktionen (KIEBER und ECKER 1993).

Nach Isolierung des *CsCTR1* Gens bei der Gurke zeigte der anschließende Sequenzvergleich zwischen den gynözischen und hermaphroditischen Linien keinen Unterschied. Expressionsanalysen bei unterschiedlichem Gewebe (Knospen, Blatt und Wurzel) zeigten auch bei der Gurke (s.o.) keine gewebespezifische Expression des Gens *CsCTR1*. Durch weitere Analysen konnten jedoch keine Expressionsunterschiede im degenerierten und entwickelten Staminagewebe nachwiesen werden.

Mutationen des in der Ethylensignaltransduktion upstream fungierenden Gens *EIN2* (siehe Kapitel 4.1.2.2; Abb. 4.2) führen zu einer vollständigen Ethyleninsensitivität der Pflanze (ROMAN et al. 1995), so dass die physiologische Funktion des Gens *EIN2* nicht mit der des *M/m* Gen identisch sein kann. Daher wurde keine Isolierung und Analyse des Gens *EIN2* bei der Gurke durchgeführt.

Eine Mutation des Transkriptionsfaktors *EIN3* zeigt bei den Pflanzen eine abgeschwächte Ethylenreaktion, so dass vermutet wird, dass die Gene *EIL1* und *EIL2* (*EIN3*-Like) mit identischer Funktion den Funktionsausfall des *EIN3* kompensieren (CHAO et al. 1997). Da diese Kompensation nicht vollständig in allen Pflanzenorganen erfolgt, besteht die Vermutung, dass die Gene *EIL1* und *EIL2* gewebespezifisch agieren (CHAO et al. 1997; zusammengefasst in MCGRATH und ECKER 1998).

Auch die Funktionsanalysen des *M/m* Gens mittels Kupfer- und Ethephonbehandlungen (siehe Kapitel 2) lassen eine rezessiv ausgeprägte und abgeschwächte Ethylenreaktion vermuten. Die Isolierung der Gene *CsEIN3*, *CsEIL1* und *CsEIL2* und der anschließende Vergleich der konservativen Sequenzbereiche zwischen gynözischen und hermaphroditischen Genotypen zeigte jedoch keine zu bestätigenden Unterschiede. Mittels Transkriptionsanalysen konnte jedoch für das Gen *CsEIL1* eine gewebespezifische Expression in Blättern und Wurzeln nachwiesen werden. Die Gene *CsEIN3* und *CsEIL2* werden hingegen in allen untersuchten Organen gleichermaßen expremiert (siehe Kapitel 4.3.2.2.2; Abb. 4.20). Bei der vergleichenden Transkriptanalyse der Gene *CsEIN3* und *CsEIL2* in degenerierten und entwickelten Staminagewebe konnte keine differentielle Transkription nachgewiesen werden. Da jedoch bei anderen Pflanzenarten weitere *EIN3* ähnliche Gene isoliert wurden, besteht auch bei der Gurke die Möglichkeit, dass weitere unbekannte *EIL*-Transkriptionsfaktoren existieren. Aus diesem Grund sollte in folgenden Arbeiten durch den Einsatz von Sonden des konservierten Bereichs der Gene *CsEIN3*, *CsEIL1* und *CsEIL2* (Homologievergleich siehe Anhang 7.7.2; Abb. 7.25) bei Northern-Hybridisierungen nach weiteren, ähnlichen Genen gesucht werden, die dann mit der Funktion des *M/m* Gen Produktes in Verbindung gebracht werden könnten.

Die am Ende der Ethylensignaltransduktion fungierenden Transkriptionsfaktoren ERF's und EREBP's weisen eine große Vielfalt auf. So wurden mittlerweile bei *Arabidopsis* 14 unterschiedliche Gene isoliert, die wahrscheinlich für *ERF* Faktoren kodieren (NCBI Datenbank). Aufgrund dieser vielfältigen Ausprägung entstehen sehr komplexe,

gewebespezifische Expressionsmuster. Die Funktion und Interaktion dieser Gene wurde lediglich für einige physiologische Mechanismen genauer untersucht (z.B. Keimung bei Tabak LEUBNER-METZGER et al. 1998), so dass keine allgemeine Aussage über die mögliche Funktion der bei der Gurke isolierten Gene *CsERF1*, *CsERF2* und *CsEREBP* erfolgen kann. Die Sequenzvergleiche der in der vorliegenden Arbeit, auch zum Teil vollständig isolierten Gene zwischen hermaphroditischen und gynözischen Pflanzen, zeigten jedoch keine Unterschiede. Auch die Expressionsanalysen der Gene *CsERF1* und *CsEREBP* konnten weder eine differentielle Transkription in den verschiedenen Organen noch einen Unterschied zwischen den degenerierten und entwickelten Stamina nachweisen. Das Gen *CsERF2*, das komplett isoliert werden konnte, zeigte keine differentielle Expression in verschiedenen Organen einer gynözischen Pflanze. Es konnten jedoch keine Transkripte in den degenerierten oder entwickelten Stamina nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.2.1; Kapitel 4.3.2.2.2). Damit kann ausgeschlossen werden, dass das Gen *CsERF2* und das *M/m* Gen identisch sind.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit jedoch existieren auch bei der Gurke eine große Anzahl von ethylenspezifischen Transkriptionsfaktoren. Durch die Isolierung der Gene *CsERF1* und *CsERF2* bzw. *CsEREBP* in der vorliegenden Arbeit, stehen konservierte Sequenzen zur Verfügung (siehe Anhang 7.7.1; Abb. 7.10 bis Abb. 7.22), die in folgenden Arbeiten als Sonden bei Northern-Hybridisierungen eingesetzt werden können, um nach weiteren ähnlichen Genen zu suchen, die dann mit der Funktion des *M/m* Gens in Verbindung gebracht werden könnten.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, molekulargenetische und physiologische Mechanismen zu charakterisieren, die zur Entstehung von eingeschlechtlichen Blüten führen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die molekulargenetische Analyse der geschlechtsdeterminierenden Majorgene *Acr/acr* und *M/m* bei der Gurke (*Cucumis sativus* L.). Die Ergebnisse sollen sowohl die Erkenntnisse über die Geschlechtsausprägung bei Blütenpflanzen erweitern als auch der praktischen Pflanzenzüchtung dienen.

Basierend auf der Ein-Hormonhypothese, mit Ethylen als Schlüsselhormon, wurden zunächst die Ergebnisse physiologischer Untersuchungen vorgestellt und diskutiert. Das Ziel dieser Untersuchungen bestand darin, weitere Informationen über die Wirkungsweise, den Wirkungsort und den Wirkungszeitpunkt der beteiligten Majorgene, insbesondere des *M/m* Gens, zu erhalten. Die Funktion des *M/m* Gens konnte als eine lokale Erhöhung der Ethylensensitivität des dritten Wirtels beschrieben werden, die zu einer Unterdrückung der Staminaentwicklung innerhalb der damit entstehenden weiblichen Blüten führt.

Der Nachweis der entwicklungsabhängigen Wirkung der geschlechtsdeterminierenden Gene, insbesondere des *M/m* Gens wurde dargestellt und diskutiert. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Physiologie der Geschlechtsausprägung wurden zur Erweiterung und Modifizierung der Ein-Hormonhypothese verwendet.

Das aus einem Rückkreuzungsprogramm verwendete isogene Pflanzenmaterial aus drei verschiedenen genetischen Hintergründen WrD, ED und ECD, wurde durch Testkreuzungen und RFLP-Analysen bezüglich des *Acr/acr* Gens charakterisiert. Dabei wurde nachgewiesen, dass alle monözisch bonitierten Pflanzen am *Acr/acr* Locus heterozygot waren. Damit entsteht in dem untersuchten Pflanzenmaterial dieser monözische Geschlechtstyp durch die unvollständige Dominanz des *Acr/acr* Gens.

Bei der Analyse von ACC-Synthase-Genen wurde eine bei der Gurke unbekannt ACC-Synthase isoliert und mit dem Namen *CsACS5* bezeichnet. Anschließende Untersuchungen konnten nur für das Gen *CsACS1* eine Kopplung mit dem *Acr/acr* Gen bzw. einen direkten Einfluß auf die Geschlechtsausprägung nachweisen.

Nach der Auswertung verschiedener Hybridisierungsmuster, die durch den Einsatz von *CsACS1* homologen Sonden nachgewiesen wurden, erfolgte die Konstruktion einer Restriktionskarte für den Locus *CsACS1*.

Anschließend wurde mittels dieser Restriktionskarte die mögliche phylogenetische Entwicklung von einer monözischen zu einer gynözischen Geschlechtsausprägung durch eine Duplikation und anschließende Mutation des Gens *CsACS1* dargestellt und diskutiert.

Der damit postulierte zusätzliche Locus wurde, wie bereits von TREBITSH, als *CsACSIG* bezeichnet. Mit Hilfe der erstellten Restriktionskarte der Gene *CsACS1* und *CsACSIG*

erfolgte die spezifische Amplifikation des vermuteten mutierten Allels des Gens *CsACSIG* mittels Einsatzes einer Splinkerette-PCR.

Durch die exklusive Amplifikation dieser erstmals in der vorliegenden Arbeit isolierten Sequenz bei gynözischen und subgynözischen Genotypen wurde mit großer Wahrscheinlichkeit das dominante *Acr*-Allel isoliert. Außerdem wurde kein Sequenzunterschied zwischen den Allelen des Gens *CsACSI* und des rezessiven *acr* Allels nachgewiesen, so dass eine ausschließliche Expression des dominanten *Acr*-Allels zur Diskussion gestellt wurde.

Zur molekularen Charakterisierung des *M/m* Gens wurden zwei sich ergänzende Strategien durchgeführt. Zum einen wurden, mittels DDRT-PCR unbekannte Gensequenzen isoliert und auf eine Korrelation mit dem *M/m* Gen analysiert, zum anderen erfolgte ein Kandidatengenansatz mit Hilfe physiologischer Funktionsstudien des *M/m* Gens (s.o.).

Mittels Durchführung des Differential Displays (DDRT-PCR) wurden 39 mRNAs nachgewiesen, die nur in weiblichen und nicht in hermaphroditischen Blütenknospen expremiert wurden. Durch die anschließende molekulargenetische Charakterisierung dieser 39 cDNA-Fragmente mittels Southern-Hybridisierungen, Sequenzierungen und Expressionsanalysen konnte keine Korrelation mit dem *M/m* Gen nachgewiesen werden. Für 22 der 39 cDNA Fragmente konnte eine Korrelation mit dem *M/m* Gen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Nach den Funktionsanalysen des *M/m* Gens im Kapitel 2 konnte ein Einfluss auf die Ethylenperzeption oder Etylensignaltransduktion durch das Produkt des *M/m* Gens vermutet werden.

Bei der Analyse der Ethylenperzeption wurde eine erhöhte Expression des Ethylenrezeptors *CsERS* im dritten Wirtel der weiblichen Blüten im Vergleich zu den hermaphroditischen Blüten nachgewiesen. Eine mögliche Beeinflussung des *M/m* Gen Produktes auf die differentielle Expression des Gens *CsERS* wurde diskutiert. Der Ethylenrezeptor *CsETR1* konnte mittels Expressionsanalysen als direkter Kandidat für das *M/m* Gen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Durch die Analyse der Ethylensignaltransduktion konnten bei der Gurke erstmals die Gene *CsCTR1*, *CsEIN3*, *CsEIL1*, *CsEIL2*, *CsERF1* und *CsEREBP* partiell und die cDNA des Gens *CsERF2* vollständig isoliert werden. Die anschließende Analyse dieser Gene bei gynözischen und hermaphroditischen Linien mittels Southern-Hybridisierungen, Sequenz- und Expressionsanalysen konnte keine Korrelation mit dem *M/m* Gen nachweisen. Der mögliche direkte oder indirekte Einfluss der isolierten Ethylensignaltransduktions-Gene auf die Funktion des *M/m* Gen Produktes wurde erörtert.

6 Literaturverzeichnis

- ABEL, S.; NGUYEN, M.N.; CHOW, W. und THEOLOGIS, A. (1995): *ACS4*, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 270, 19093-19099.
- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W. und SALTVEIT JR., M.E. (1992): *Ethylene in plant biology*. Academic Press, San Diego.
- ADAMS, D.O. und YANG S.F. (1979): Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 170-174.
- AINSWORTH, C. (1999): *Sex determination in plants*. Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- AINSWORTH, C.; CROSSLY, S.; BUCHANAN-WOLLASTON, V.; THANGAVELU, M. und PARKER, J. (1995): Male and female of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. *Plant Cell* 7, 1583-1598.
- AINSWORTH, C.; PARKER J. und BUCHANAN-WOLLASTON V. (1998): *Sex Determination in Plants*. *Curr. Topic. Develop. Biol.* 38, 167-223.
- ALEXANDER, L. und GRIERSON, D. (2002): Ethylene biosynthesis and action in tomato: A model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Biol* 53 (377), 2039-2055.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. und MILLER, W.; LIPMAN, D.J. (1997): GAPPED BLAST AND PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.
- ANGENENT, G.C.; FRANKEN, J.; BUSSCHER, M.; COLOMBO, L. und VAN TUNEN, A.J. (1993): Petal and stamen formation in petunia is regulated by the homeotic gene *fbp1*. *Plant J.* 4, 101-112.
- ATSMON, D. (1968): The interaction of genetic, environmental, and hormonal factors in stem elongation and floral development of cucumber plants. *Ann. Bot.* 32, 877-882.
- ATSMON, D. und GALUN, E. (1960): A morphogenetic study of staminate, pistillate and hermaphrodite flower in *Cucumis sativus* (L.). *Phytomorphology* 10, 110-115.
- ATSMON, D. und GALUN, E. (1962): Physiology of sex in *Cucumis sativus* L. Leaf age patterns and sexual differentiation of floral buds. *Ann. Bot.* 26, 137-146.
- ATSMON, D. und TABBAK, C. (1979): Comparative effects of gibberelline, silver nitrate and aminoethoxyvinyl glycine on sexual tendency and ethylene evolution in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Physiol.* 20, 1547-1555.

- ATSMON, D.; GALUN, E und L und JAKOB, K. M. (1965): Relative time of anthesis in pistillate and staminate cucumber flowers. *Ann. Bot.* 29, 277-282.
- ATSMON, D.; LANG, A. und LIGHT, E. N. (1968): Contents and recovery of gibberellins in monoecious and gynoeceous cucumber plants. *Plant Physiol.* 43, 806-810.
- BARRY, C.S.; BLUME, B.; BOUZAYEN, M.; COOPER, W.; HAMILTON, A.J. und GRIERSON, D. (1996): Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* 9, 525-535.
- BEYER, JR. E.M. (1972): Mechanism of ethylene action. Biological activity of deuterated ethylene and evidence against isotopic exchange and cis-trans-isomerization. *Plant Physiol.* 49, 672-675.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G. und GRESSOFF, P. (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196, 80-83.
- BAUER, D.; MÜLLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHÖE, P. und STRAUSS, M. (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique. *Nucl. Acids Res.* 21, 18-26.
- BAUER, D.; MÜLLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHÖE, P. und STRAUSS, M. (1994): Differential Display Reverse Transcription PCR. *Bio.Tec.* 2, 32-35.
- BAWA, K.S. (1980): Evolution of dioecy in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11, 15-39.
- BENTZEN, P.; COOK, D.; DENTI, D.; HARRIS, A.; HOFMAN J. und WRIGHT, J.M. (1990): One tube DNA extraction procedure for molecular fingerprinting. *Fingerprint News* 2, 17-21.
- BERNMAN, S.D.; FELDMAN, M. und GALUN, E. (1977): Sex determination in tetraploid cucumbers. *J. Herd.* 68, 167-171.
- BEYER, JR. E.M. (1976a): A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol.* 58, 268-271.
- BEYER, JR. E.M. (1976b): Silver ion: A potent antiethylene agent in cucumber and tomato, *Hort Sci.* 11, 195-196.
- BEYER, Jr. E.M. (1979): Effect of silver ion, carbon dioxide and oxygen on ethylene action and metabolism. *Plant Physiol.* 63, 169-173.
- BLEECKER, A. B. (1999): Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Sci.* 4, 269-274.
- BLEECKER, A.B.; ESCH, J.J.; HALL, A.E.; RODRIGES, F. I. und BINDER, B.M. (1998): The ethylene-receptor family from Arabidopsis: Structure and function. *Phil. Trans. Royal Soc. London Biol. Sci.* 353 (1374) 1405-1412.

- BOWMAN, J.L.; SMYTH, D.R. und MEYEROWITZ, E.M. (1989): Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1, 37-52.
- BOWMAN, J.L.; SMYTH, D.R. und MEYEROWITZ, E.M. (1991): Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112, 1-20.
- BRACALE, I.; CAPORALI, E.; GALLI, M.G.; LONGO, C.; MARZIANI-LONGO, G.; ROSSI, G. SPADA, A.; SOAVE, E.; FALAVIGNA, A.; RAFFALDI, F.; MAESTRI, E.; RESTIVO, F.M. und TASSI, F. (1991): Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Plant Sci.* 80, 67-77.
- BRADFORD, K.J. und YANG, S.F. (1980): Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. *Plant Physiol.* 65, 322-326.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. und JONES, R.L. (2000): *Biochemistry & molecular biology of plant*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
- BURG, S.P. und BURG, E.A. (1967): Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.* 42, 144-152.
- CANTLIFFE, D.J. (1981): Alternation of sex-expression in cucumber due to changes in temperature, light intensity and photoperiod. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 106, 133-136.
- CAPORALI, E.; CARBONI, A.; GALLI, M.G.; RESSI, G.; SPADA, A. und MARZIANI LONGO, G.P. (1994): Development of male and female flower in *Asparagus officinalis*. Search for point of transition from hermaphroditic to unisexual development pathway. *Sex Plant Reprod.* 7, 239-249.
- CARPENER, R. und COEN, E.S. (1990): Floral homeotic mutations produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes and Development* 4, 1483-1493.
- CHAILAKHYAN, M.K. (1979): Genetic and hormonal regulation of growth, flowering and sex expression in plants. *Am. J. Bot.* 66, 717-736.
- CHAILAKHYAN, M.K. und KHRIANIN, V.N. (1987): *Sexuality in plants and its hormonal regulation*. Springer-Verlag, New York.
- CHANG, C. und SHOKEY, J. A. (1999): The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Cur. Opin. in Plant Biol.* 2, 352-358.
- CHAO, Q.; ROTHENBERG, M.; SOLANO, R. ROMAN, G.; TERZAGHI, W. und ECKER J. (1997): Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLEN-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89, 1133-1144.
- CHARLSWORTH, D. und CHARLSWORTH, B. (1987): The effect of investment in attractive structures on allocation to male and female function in plants. *Evolution* 41, 948-968.
- CHEN, Q. und BLEECKER, A. (1995): Analysis of ethylene signal-transduction kinetics associated with seedling-growth response and chitinase induction in wild-type and mutant *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 108, 597-607.

- CHENG, P.C.; GREYSON, R.I. und WALDEN, D.B. (1983): Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *Am. J. Bot.* 70 (3), 450-462.
- CLARK, K.L.; LARSEN, P.B.; WANG, X. und CHANG, C. (1998): Association of the *Arabidopsis CTR1* Raf-like kinase with the *ETR1* and *ERS* ethylene receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5401-5406.
- CLARK, R.K. und KENNEY, D.S. (1969): Comparison of staminate flower production on gynoeocious strains of cucumbers, *Cucumis sativus* L. by pure gibberellins (A₃, A₄, A₇, A₁₃) and mixtures. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 94, 131-132.
- COBB, D. und CARKSON, M. (1994): A simple procedure for optimizing the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nuc. Ac. Res.* 22, 3801-3805.
- COEN, E.S. und MEYEROWITZ, E.M. (1991): The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31-37.
- COEN, E.S.; ROMERO, J.M.; DOYLE, S.; ELLIOT, R.; MURPHY, G. und CARPENTER, R. (1990): Floricaula: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63, 1311-1322.
- DAVIES, P.J. (1995): *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- DELLAPORTA, S.L. und CALDERON-URREA, A. (1993): Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5, 1241-1251.
- DEN NIJS A.P.M. und VISSER, D.L. (1980): Induction of male flowering in gynoeocious cucumbers (*Cucumis sativus* L.) by silver ions. *Euphytica* 29, 273-280.
- DESTEFANO-BELTRAN, L.J.C.; CAENEGHEM, W.V.; GIELEN, J.; RICHARD, L.; MONTEGU, M.V. und STRAETEN, D.V.D. (1995): Characterization of three members of the ACC synthase gene family in *Solanum tuberosum* L.. *Mol. Gen. Genet* 246, 496-508.
- DEVON, R.; PORTEOUS, D.J. und BROOKES, A. J. (1995): Splinkerettes-improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucl. Acids Res.* 23 (9), 1644-1645.
- DEWAL, G. (2001): Beiträge zur molekularen Charakterisierung der unterschiedlichen Formen der männlichen Sterilität bei *Allium schoenoprasum* L. Diss., Univ. Hannover.
- DOLAN, L. (1997): The role of ethylene in the development of plant form. *J. Exp. Biol.* 48, (307)201-210.
- DURAND, R. und DURAND, B. (1984): Sexual differentiation in higher plants. *Physiologia Plantarum* 60, 267-274.
- ELESE, M.A.; DAVIES, W.J.; HALL, K.C. und JACKSON, M.B. (1993): Knowledge of xylem sap flow rate is a pre-requisite for accurate estimates of hormone transport from roots to shoots. In: PECH, J. C. (Hrsg.), *Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 373-374.

- ENGELKE, T. (1999): Genetischer und molekularer Vergleich verschiedener Formen der männlichen Sterilität als Beitrag zur Etablierung von Hybridzuchtverfahren.-*Allium schoenoprasum* L.: Eine Pflanze mit Modellcharakter. Diss., Univ. Hannover.
- FILYPECKI, M. K.; SOMMER, H und MALRPSZY, S. (1997): The mads-box gene *CUS1* is expressed during cucumber somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 125, 63-74.
- FLUHR, R.(1998): Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction (review). *Trends in plant science* 3, 141-146.
- FLUHR, R., und MATTOO, A. K. (1996): Ethylene biosynthesis and perception. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 479-523.
- FRANKEL, R. und GALUN, E. (1977): Pollination mechanisms. *Reproduction and Plant breeding*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- FRANKEN, S. (1979): Untersuchungen zur Vererbung vegetativer Merkmale und des Hermaphroditismus sowie zur Ertragsfähigkeit determinierter Einlegegurken (*Cucumis sativus* L.). Diss. Fak. für Gartenbau und Landeskultur der Univ. Hannover.
- FRIEDLANDER, M.; ATSMON, D. und GALUN, E. (1977a): Sexual differentiation in cucumber: the effects of abscisic acid and other growth regulators on various sex genotypes. *Plant Cell Physiol.* 18, 261-269.
- FRIEDLANDER, M.; ATSMON, D. und GALUN, E. (1977b): The effect of grafting on sex expression in cucumber: *Plant and Cell Physiol.* 18, 1343-1350.
- FUCHS, E.; ATSMON, D. und HAVERY, A.H. (1977): Adventitious staminate flower formation in gibberelline treated gynocious cucumber plants. *Plant Cell Physiol.* 18, 1193-1201.
- GALUN, E. (1959a): The role of auxins in the sex expression of cucumber. *Physiol. Plant* 12, 48-61.
- GALUN, E. (1959b): Effect of gibberellic acid and naphthalene acetic acid on sex expression and some morphological characters in the cucumber plants. *Phyton.* 13, 1-8.
- GALUN, E. (1961): Study of the inheritance of sex expression in the cucumber: the interaction of major genes with modifying genetic and non-genetic factors. *Genetica* 32, 134-163.
- GALUN, E. (1974): The use of genetic sex types for hybrid seed production in cucumis. In: MOAV, R.I. (Hrsg.): *In Agricultural genetics (Selected Tropics)*. John Wiley and Sons, New York – Toronto 23-56.
- GAMBLE, R.L.; COONFIELD, M.L. und SCHALLER, G.E. (1998): Histidine kinase activity of the *ETR1* ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7825-7829.
- GARCIA-MAROTO, F.; SALAMINI, F. und ROHDE, W. (1993): Molecular cloning and expression patterns of three alleles of the deficiens homologous gene *St-deficiens* from *Solanum tuberosum*. *Plant J.* 4, 771-780.

- GEORGE, W.L. (1971): Influence of genetic background on sex conversion by 2-chloroethylphosphonic acid in monoecious cucumbers J. Am. Soc. Hortic. Sci. 96, 152-154.
- GÖNEN, Y. (1975): Untersuchungen zur Vererbung des Geschlechts und Wuchstyps sowie der Ertragsfähigkeit bei Einlegegurken (*Cucumis sativus* L.) im Hinblick auf die maschinelle Ernte. Diss. Fak. für Gartenbau und Landeskultur der Univ. Hannover.
- GUILFOYLE, T.J. und HAGEN, G. (2001): Auxin response factors. J. Plant Grow. Reg. 20 (3), 281-291.
- HALL, A.E.; FINDELL, J.L.; SCHALLER, G.E.; SISLER, E.C. und BLEECKER, A.B. (2000): Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. Plant Physiol. 123, 1449-1457.
- HALL, M.A.; SMITH, A.R.; NOVIKOVA, G.V. und MOSHKOV, I. E. (1998): Ethylene signal transduction in relation to hormone sensitivity. Plant Biol, 46-56.
- HANSEN, G.; ESTRUCH, J.J.; SOMMER, H. und SPENA, A. (1993): NTGLO: A tobacco homologue of GLOBOSA floral homeotic gene of *Antirrhinum majus*: cDNA sequence and expression pattern. Mol. Gen. Genet. 239, 310-312.
- HARDENACK, S.; YE, D.; SAEDLER, H. und GRANT, S. (1994): Comparison of MADS box gene expression in developing male und female flowers of dioecious plant white campion. Plant Cell 6. 1775-1787.
- HIRAYAMA, T. und ALONSO, J. M. (2000): Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. Plant Cell Physiol., 41 (5), 548-555.
- HUA, J. und MEYEROWITZ, E.M. (1998): Ethylene responses are negatively regulated by receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. Cell 94, 261-271.
- HUA, J.; CHANG, C.; SUN, Q. und MEYEROWITZ, E.M. (1995): Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. Science 269, 1712-1714.
- HUA, J.; SAKAI, H.; NOURIZADEH, S.; CHEN, Q.G.; BLEECKER, A.B.; ECKER, J.R. und MEYEROWITZ, E.M. (1998): *EIN4* und *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. Plant Cell 10, 1321-1332.
- HUANG, P. L.; PARKS, J. E.; ROTTMANN, W. H. und THEOLOGIS, A. (1991): Two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini (*Cucurbita pepo*) are clustered and similar but differentially regulated. Proc Natl. Sci. USA 88, 7021-7025.
- HUME, B. und LOVELL, P.H. (1983): Role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Cucurbita pepo*. Physiol. Plant 59, 324-328.
- INABA, A.; GAO, J. P. und NAKAMURA, R. (1991): Induction by electric currents of ethylene biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit. Plant Physiol. Rockville 97 (3), 1161-1165.

- IRISH, E.E. und NELSON, T. (1989): Sex determination in monoecious and dioecious plants. *Plant Cell* 1, 737-744.
- IWAHORI, S.; LYONS, J.M. und SMITH O.E. (1970): Sex expression in cucumber plants as affected by 2-chloroethylphosphonic acid, ethylene and growth regulators. *Plant Physiol.* 46, 412-415.
- JACK, T.; BOCKMAN, L.L. und MEYEROWITZ, E.M. (1992): The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes an MADS-box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68, 683-697.
- KAHANA, A.; SILBERSTEIN, L.; KESSLER, N.; GOLDSTEIN, R. S. und PERL-TREVES, R. (1999): Expression of ACC oxidase genes differs among sex genotypes and sex phases in cucumber. *Plant Mol. Biol.* 41, 517-528.
- KALLOO, R.K.J. und FRANKEN, S. (1978): Chemical induction of staminate flowers in four determinate gynoeious lines of pickling cucumber. *Gartenbauwissenschaften* 43, 280-282.
- KAMACHI, S.; MIZUSAWA H.; MAZUURA S. und SAKAI, S. (2000): Expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes, *CS-ACSI* and *CS-ASC2*, correlated with sex phenotypes in cucumis plants (*Cucumis sativus* L.) *Plant Biotech.* 17 (1), 69-74.
- KAMACHI, S.; SEKIMOTO, H.; KONDO, N. und SAKAI, S. (1997): Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Physiol.* 38 (11), 1197-1206.
- KANDELER, R. (1972): *Entwicklungsphysiologie der Pflanzen*. Springer Verlag, Berlin.
- KATER, M.M.; COLOMBO, L.; FRANKEN, J.; BUSSCHER, J. MASIERO, S.; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M.M. und ANGENENT, G.C. (1998): Multiple AGAMOSE homologues from cucumber and petunia differ in their ability to induce reproductive organ fate. *Plant Cell* 10, 171-182.
- CATER, M.M.; FRANKEN J.; CARNEY, K.J.; COLOMBO, L. und ANGENENT, G.C. (2001): Sex determination in the monoecious species cucumber is confined to specific floral whorls. *Plant Cell.* 13 (3), 481-493.
- KENDE, H. (1993): Ethylene biosynthesis. *Annu E' Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 283-307.
- KIEBER, J.J. (1997): The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 32, 227-254.
- KIEBER, J.J. und ECKER, J.R. (1993): Ethylene gas: it's not just for ripening any more! *TIG* 9, 356-362.

- KIEBER, J.J. und ECKER, J.R. (1994): Molecular genetic analysis of plant development and metabolism. in plant molecular biology, Hrsg. GORUZZI G. and PUIGDOMENECH P., Springer- Verlag Berlin, 193-201.
- KIEBER, J.J.; ROTHENBERG, M. ROMAN, G.; FELDMANN, K.A. und ECKER, J.R. (1993): *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72, 427-441.
- KLÄMBT, D. (1987): Plant hormone receptors. Springer Verlag, New York.
- KOVTUN, Y.; CHIU, W.-L., ZENG, W. und SHEEN, J. (1998): Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395, 716-720.
- KUBICKI, B. (1969a): Investigations on sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). III. Variability of sex expression in the monoecious and gynoecious lines, *Genet. Pol.* 10, 5-22.
- KUBICKI, B. (1969b): Investigations on sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). IV. Multiple alleles of locus *Acr*, *Genet. Pol.* 10, 23-68.
- KUBICKI, B. (1969c): Investigations on sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). V. Genes controlling intensity of femaleness, *Genet. Pol.* 10, 69-86.
- KUBICKI, B. (1969d): Investigations on sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). VI. Androecism. *Genet. Pol.* 10, 87-100.
- KUBICKI, B. (1969e): Investigations on sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). VII. Andromonoecism and hermaphroditism, *Genet. Pol.* 10, 101-122.
- KUBICKI, B. (1969f): Investigations on sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). VIII. Trimonocism. *Genet. Pol.* 10, 115-125.
- KUBICKI, B. (1972): The mechanism of sex determination in flowering plants. *Genetica Polnica* 13, 53-66.
- KUBICKI, B. (1974): New sex types in cucumber and their uses in breeding. XIX-th Internat. Hort. Congr. Warszawa, 475-485.
- KUBICKI, B. (1980): Investigation on sex determination in cucumbers (*Cucumis sativus* L.) IX. Induced mutant with the recessive character of gynoecism. *Genetica Polnica*, 21, 409-424.
- LAIBACH, F. und KRIBBEN, F.J. (1950): Der Einfluß von Wuchsstoffen auf die Bildung männlicher und weiblicher Blüten bei einer monözischen Pflanze (*Cucumis sativus* L.). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 62, 53-55.
- LASHBROOK, C.C.; TIEMAN, D.M. und KLEE, H.J. (1998): Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. *Plant J.* 15, 243-252.
- LAWTON, K.A.; POTTER, S.L.; UNKNES, S. und RYALS, J. (1994): Acquired resistancesignal transduction *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* 6, 581-588.

- LEBEL-HARDENACK, S. und GRANT S.R. (1997): Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Sci.* 2, 130-136.
- LEUBNER-METZGER, G.; PETRUZZELLI, L.; WALTVOGEL, R.; VOGELI, L.R. und MEINS, F. (1998): Ethylene-responsive element binding protein (*EREBP*) expression and the transcriptional regulation of class I beta-1,3-glucanase during tobacco seed germination. *Plant Mol Biol.* 38 (5), 785-795.
- LIANG, P. und PARDEE, A.B. (1992): Differential display of eucariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*: 257, 967-971.
- LIANG, P.; AVERBOUKH, L. und PARDEE, A.B. (1993): Distribution and cloning of eucariotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Research* 21, 3269-3275.
- LIANG, X.; ABEL, S.; KELLER, J.A.; SHEN, N.F. und THEOLOGIS, A. (1992): The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11046-11050.
- LICOLN J.E.; CAMPPELL, A.D.; OETIKER, J.; ROTTMANN, W.H.; OELLER, P.W.; SHEN-NANCY, F. und THEOLOGIS, A. (1993): *LE-ACS4*, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*): Expression in *Escherichia coli* structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis. *J. Biol. Chem.* 268 (26), 19422-19430.
- LOHMANN, J.; SCHIKLE, H.P. und BOSCH, T.C.G. (1995): REN Display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Bio.Tech.* 18,200-202.
- LOWER, R.L. (1975): Effects of temperature and photoperiod on plant growth and sex-expression of cucumber. *Hort. Sci.* 10, 318-326.
- LOWER, R.L. und EDWARDS, M.D. (1986): Cucumber breeding. In: *Breeding Vegetable Crops* BASSET, M.J. (Hrsg.), AVI, Publishing Co. Westport, Coneticut, 173-207.
- MA, H.; YANPFESKY M.F. und MEYEROWITZ E.M. (1991): *AGLI-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev.* 5, 484-495.
- MALEPSZY, S. und NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. (1991): Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a modelsystem for molecular biology. *Plant Sci.* 80, 39-47.
- MANDEL, M.A.; C. GUSTAFSON-BROWN, B.; SAVIDGE und Yanofsky (1992): Molecular characterization of *Arabidopsis* floral homeotic gene *ABETELA1*. *Nature* 260;273-277.
- MARZIANI, G.; CAPORALI, E. und SPADA, A. (1999): Search for genes involved in asparagus sex determination; eds. C.C. Ainsworth (Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford), 149-162.

- MATHOOKO, F. M., INABA, A. und NAKAMURA, R (1998): Characterization of carbon dioxide stress-induced ethylene biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit. *Plant Cell Physiol.* 39, 285-293.
- MATHOOKO, F. M.; ONO, T.; KUBO, Y.; INABA, A. und NAKAMURA, R. (1997): Differential regulation of wounded-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity and gene expression in mesocarp tissue of winter squash fruit by carbon dioxide and diazocyclopentadiene. *J. Agric. Sci. Technol.* 1, 1-14.
- MATHOOKO, F. M.; OMWANIKI, M. W.; NAKATSUKA, A.; SHIOMI, S.; KUBO, Y.; INABA, A. und NAKAMURA, R. (1999): Expression characteristics of *CS-ACS1*, *CS-ACS2* und *CS-ACS3*, three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit under carbon dioxide stress. *Plant Cell Physiol.* 40, 164-172.
- MCGRATH, R. und ECKER, J.R. (1998): Ethylene signaling in *Arabidopsis*: events from the membrane to the nucleus. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 103-113.
- MENA, M.; AMBROSE, B.A.; MEELEY, R.B.; BRIGGS, S.M.; YANOFSKY, M.F. und SCHMIDT, R.J. (1996): Diversification of C-function activity in maize flower development. *Science* 274, 1537-1539.
- MIBUS, H.(2002): Molekulare Charakterisierung der Geschlechtsausprägung bei der Gurke (*Cucumis sativus* L.) Kurt von Rümker Vortrag. *Votr. Pflanzenzüchtung*, 54: 231-234.
- MIBUS, H.; VURAL, I. und TATLIOGLU, T. (2000): Investigations of sex expression of *Cucumis sativus* by grafting and copper application. *Acta Hort.* 510, 211-218.
- MICHELMORE, R.; PARAN, I. und KESSELI, R.V. (1991): Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88, 98238-9832.
- MILLER, H.G.; KOCHER, T.D. und LOY, B. (1995): New MADS box domains in *Asparagus officinalis* L. *Sex Plant Reprod.* 8, 318-320.
- MITA, S.; KAWAMURA, S. und ASAI, T. (2002): Regulation of the expression of a putative ethylene receptor, PeERS2, during the development of passion fruit (*Passiflora edulis*). *Physiol. Planta.* 114(2), 271-280
- MIZUSAWA, H. und MATSUURA, S. (1999): The relationship between ACC synthase (*CS-ACS2*) and monoecious sex phenotype in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Cucurbit Gen. Coop. Rep.* 22, 1-2.
- MOHAN RAM, H.Y. und NATH, R. (1964): The morphology and embryology of *Cannabis sativa* Linn. *Phytomorphology* 14, 414-429.
- MOHR, H. und SCHOPFER, P. (1992): *Pflanzenphysiologie*. Springer Verlag, Berlin.

- MULKEY, W. A. und PIKE, L. M (1972): Stability of gynoecism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) as affected by hybridization with the hermaphrodite „Tamu 950“. Hort. Science 7, 284-285.
- MÜLLER, R.; STUMMANN B.M. und SEREK, M. (2000): Characterization of an ethylene receptor family with differential expression in rose (*Rosa hybrida* L.) flowers. Plant Cell Reports 19: 1232-1239.
- NAKAGAWA, N.; MORI, H.; YAMAZAKI, K. und IMASEKI, H. (1991): Cloning of a complementary DNA for auxin-induce 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding. Plant Cell Physiol. 32, 1153-1163.
- NITSCH, J. P.; KURTZ, E.B.; LIVERMAN, J.L. und WENT, F.W. (1952): The development of sex expression in Cucurbita flowers. Am. J. Bot. 39, 32-43.
- OLSON, D.C.; WHITE, J.A.; EDELMAN, L.; HARKINS, R.N. und KENDE, H. (1991): Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. Proc. Natl. acad. Sci. USA 88, 5340-5344.
- OWENS, K.W.; TOLLA, G.E. und PETERSON, C.E. (1980): Induction of staminate flowers on gynoecious cucumber by aminoethoxyvinylglycine. Hort. Science 15, 256-257.
- PERL-TREVES, R. (1999): Male to female conversion along the cucumber shoot: approaches to studying sex genes and floral development in *Cucumis sativus*. In: Sex determination in plants, eds. C.C. Ainsworth (Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford), pp 189-216
- PERL-TREVES, R.; KAHANA, A. und KROACH, T. und KESSLER, N. (1998b): Cloning of three cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidases from cucumber floral buds. Plant Physiol. 116, 1192.
- PERL-TREVES, R.; KAHANA, A.; ROSENMAN, N.; YU, X. und SILBERSTEIN, L. (1998a): Expression of multiple AGAMOUS-like genes in male and female flowers of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Physiol. 39, 701-710.
- PIERCE, L. K. und WEHNER, T.C. (1990): Review of Genes and lineage groups in Cucumber. Hort Sci. 25 (6), 605-615.
- PIKE, L. M. und MULKEY, W. A. (1971): Use of hermaphrodite cucumber lines in development of gynoecious hybrids. Hort. Science 6, 339-340.
- PNUELI, L.; ABDU-ABDEID, M; ZAMIR, D.; NACKEN, W.; SCHWARZ-SOMMER, Z. und LIFSCHITZ, E. (1991): The MADS box gene family in tomato: Temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. Plant J. 1, 255-266.
- ROBINSON, R.W.; MUNGER, H.M.; WHITAKER, T.W. und BOHN, G.M. (1976): Genes of *Cucubitateae*. Hort. Science 11, 554-568.
- ROBINSON, R.W.; SHANNON, S.; MANUEL, G. und GUARDIA, M.D. (1969): Regulation of sex expression in the cucumber. Bio. Sci. 19, 141-142.

- RODRIGUEZ, F.I.; ESCH, J.J.; HALL, Q.A.E.; BINDER, B.M.; SCHALLER, G.E. und BLEECKER, A.B. (1999): A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283, 996-998.
- ROMAN, G.; LUBARSKY, B.; KIEBER, J.; ROTHENBERG, M. und ECKER, J. (1995): Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis*. *Genetics* 139, 1393-1409.
- ROSA, J. T. (1928): The inheritance of flower types in *Cucumis* and *Citrullus*. *Hilgardia* 3, 233-250.
- ROSS, J. und O'NEIL D. (2001): New interactions between classical plant hormones. *Trends in Plant Sci.*, 6 (1), 2-4.
- ROTTMANN, W.H.; PETER, G.F.; OELLER, P.W.; KELLER, J.A.; SHEN, N.F.; NAGY, B.P.; TAYLOR, L.P. und THEOLOGIS, A. (1991): 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J. Mol. Biol.* 222, 937-961.
- RUDICH, J. (1985): *Cucumis sativus*. In: HALEVY, A.H. (Hrsg.), *CRC handbook of flowering*. Boca Raton, FL: CRC Press, 365-374.
- RUDICH, J. und HALEVY, A.N. (1974): Involvement of abscisic acid in the regulation of sex expression in the cucumber. *Plant Cell Physiol.* 15, 635-637.
- RUDICH, J.; HALEVY, A. H. und KEDAR, N. (1972b): The level of phytohormones in monoecious and gynoecious cucumbers as affected by photoperiod and Ethephone. *Plant Physiol.* 50, 585-590.
- RUDICH, J.; HALEVY, A.H. und KEDAR, N. (1969): Increase in femaleness of three cucurbits by treatment with ethrel, an ethylene releasing compound. *Planta* 86, 69-76.
- RUDICH, J.; HALEVY, A.H. und KEDAR, N. (1972a): Ethylene evolution from cucumber plants as related to sex expression. *Plant Physiol.* 49, 998-999.
- SACHS, L. (1978): *Angewandte Statistik, Statistische Methoden und ihre Anwendungen*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMANN, K.M.; JORGENSEN, R.A. und ALLARD R.W. (1984): Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 8014-8018.
- SAITO, T. und ITO, H. (1964): Factors responsible for the sex expression of cucumber plant XIV. Auxin and gibberelline content in the stem apex and the sex pattern of flowers. *Toho J. Agric. Res.* 14, 227-239.
- SAKAI, H.; HUA, J.; CHEN, Q.G.; CHANG, C.; MEDRANO, L.J.; BLEECKER, A.B. und MEYEROWITZ, E.M. (1998): *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5812-5817.

- SAKAI, H.; MEDRANO, L.J. und MEYEROWITZ, E.M. (1995): Role of SUPERMAN in maintaining *Arabidopsis* floral world boundaries. *Nature* 378, 199-203.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. und MANIATIS, T. (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SARAF-LEVY, T.; KAHANA, A.; KESSLER, N. SILBERSTEIN, L. WANG, Y.; GAL-ON und A. und PERL-TREVES, R. (2000) Genes involved in ethylene synthesis and perception in cucumber. *Acta Hort.* 510, 463-470.
- SATO, N.K.; YUHSHI, K.I.; HIGASHI, K.; HOSOYA, K.; KUBOTA und M. EZURA, H. (1999): Stage- and tissue-specific expression of ethylene receptor homologue genes during fruit development in muskmelon. *Plant Physiol. Rockville* 120 (1), 321-329
- SATO, T. und THEOLOGIS, T. (1989): Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key regulatory enzyme for the ethylene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6621-6625.
- SCHALLER, G.E.; LADD, A.N.; LANAHAN, M.B.; SPANBAUER, J.M. und BLEEKER, A.B. (1995): The ethylene response mediator *ETR1* from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* 270, 1809-1811.
- SCHMIDT, R.T.; VEIT, B.; MANDEL, M.A.; MENA, M.; HAKE, S. und YANOFSKY, M.F. (1993): Identification and molecular characterization of ZAG1, the maize homologue of the *Arabidopsis* floral homeotic gene AGAMOS. *Plant Cell* 5, 729-737.
- SCHWARZ-SOMMER, Z.S.; HUIJSER, P.; NACKEN, W.; SAEDELER, H. und SOMMER, H. (1990): Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250, 931-936.
- SCOTT, J. und BAKER, L. R. (1976): Sex Expression pf single and 3-way cross cucumber hybrids with androecious pollinators. *Hort Sci* 11, 243-245.
- SEHEPHARD, H.; PARKER J.; DARBY, P. und AINSWORTH, C.C. (1999): Sex expression in hop (*Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Sieb. et Zucc.): floral morphology and sex chromosomes; eds. C.C. Ainsworth (Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford), 137-148.
- SEREK, M.; SISLER, E.C. und REID, M.S. (1994): Novel gaseous ethylene binding inhibitor prevents ethylene effects in potted flowering plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119, 1230-1233.
- SERQUEN, F. C.; BACHER, J. und STAUB, J.E. (1997): Mapping and QTL analysis of horticultural traits in a narrow cross in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using random-amplified polymorphic DNA markers *Mol Breeding*, 3, 257-268.
- SHANNON, S. und DE LE GUARDIA, C. (1969): Sex expression and the production of ethylene induced by auxin in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Nature* 223, 186.
- SHECHTER, S.; GOLDSCHMIDT, E.E. und GALILI, D. (1989): Persistence of (¹⁴C) gibberellin A₃ and (³H) gibberellin A₁ in senescing, ethylene treated citrus and tomato fruit. *Plant Growth Regul.* 8, 243-253.

- SHERRY, R. A.; ECKARD, K.J. und LORD, E.M. (1993): Flower development in dioecious *Spinacia oleracea* (Chenopodiaceae). Am. J. Bot. 80, 283-291.
- SHIFRIS, O. (1961): Sex control in cucumbers. J. Hered 52, 5-12.
- SHIFRIS, O. und GEORGE, W.L. (1964): Sensitivity of female inbreeds of *Cucumis sativus* to sex reversion by gibberellin. Science 143, 1452-1453.
- SHIFRIS, O.; GEORGE, W.L. und Quinones, J.A. (1964): Gynodioecism in Cucumbers. Genetics 49, 285-291.
- SHIOMI, S.; YAMAMOTO, M.; ONO, T.; KAKIUCHI, K., NAKAMOTO, J.; NAKATSUKA, A.; KUBO, Y.; NAKAMURA, R.; INABA, A. und IMASEKI, H. (1998): cDNA cloning of ACC Synthase and ACC Oxidase genes in cucumber fruit and their differential expression by wounding and Auxin. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67, 685-692.
- SHORE, P. und SHARROCS, A.D. (1995): The MADS box family of transcription factors. Eur. J. Biochem. 229, 1-13.
- SOLANO, R.; STEPANOVA, A.; CHAO, Q. und ECKER, J.R. (1998): Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVES3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. Genes Dev. 12, 3703-3714.
- SOMMER, H.; BELTRÀN, J.P.; HUIJSER, P.; PAPE, H.; LÖNNIG, W.-E.; SAEDLER, H. und SCHWARZ- SOMMER, Z. (1990): Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. EMBO J. 9, 605-613.
- TAKAHASHI, H. und JAFFE, M.J. (1984): Further studies of auxin and ACC induced feminization in the cucumber plant using ethylene inhibitors. Phyton. 44, 81-86.
- TAKAHASHI, H. und SUGE, H. (1982): Sex expression and ethylene production in cucumber plants as affected by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 51, 51-55.
- TAKAHASHI, H.; SAITO, T. und SUGE, H. (1983): Separation of effects of photoperiod and hormones on sex expression in cucumber. Plant Cell Physiol. 24, 142-154.
- TANDRE, K.; ALBERT V.A.; SUNDAS A. und ENGSTRÖM P. (1995): Conifer homologues to genes that control flower development in angiosperms. Plant Mol. Biol. 27: 69-78.
- TANG, X.; WANG, H.; BRANDT, A. S. und WOODSON, W. R. (1993): Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from *Petunia hybrida*. Plant Mol. Biol. 23, 1151-1164.
- TATLIOGLU, T. (1981): Stand und Möglichkeiten der Züchtung von Einlegegurkensorten für eine maschinelle Ernte unter besonderer Berücksichtigung des determinierten Wuchstyps. Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung 66, 303-311.
- TATLIOGLU, T. (1993): Cucumber, *Cucumis sativus* L.. In: KALLOO, G., BERGH, B.O. (Hrsg.): Genetic improvement of vegetable crops. Pergamon Press, Oxford, U.K., 197-234.

- TATLOGLU, T. (1983): Einfluß des Geschlechts des männlichen Hybridelters auf die Konstanz der Weiblichkeit der F₁-Hybriden bei Einlegegurken (*Cucumis sativus* L.), Z. Pflanzenzüchtung. 91, 140-153.
- TEN-HAVE, A. und WOLTERING, E. J. (1997): Ethylene biosynthetic genes are differentially expressed during carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flower senescence. Plant Mol. Biol. 34 (1), 89-97.
- THEISSEN, G. und SEIDLER, H. (1995): MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. Curr. Opin. Genet. Dev. 5, 628-639.
- THEISSEN, G.; KIM, J.T. und SAEDLER, H. (1996): Classification and phylogeny of the MADS-Box multigene family suggest defined roles of MADS-Box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. J. Mol. Evol. 43, 484-516.
- THEISSEN, G.; STRATER, T.; FISCHER, A. und SAEDLER, H. (1995): Structural characterization, chromosomal localization and phylogenetic evaluation of two pairs of AGAMOS-like MADS-box genes from maize. Gene 156, 155-166.
- TIEMAN, D.M. und KLEE, H.J. (1999): Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. Plant Physiol. Rockville; 120 (1): 165-172.
- TJEDJENS, V.A. (1928): Sex ratios in cucumber flowers as affected by different conditions of soil and light. J. Agr. Res. 36, 721-726.
- TKACHENKO, N.N. (1935): Preliminary results of a genetic investigation of the cucumber-*Cucumis sativus* L. Bul. Appl. Pl. Breed. Ser. 2, 3, 311-356.
- TREBITSH, T.; RIOV, J. und RUDICH, J. (1987): Auxin, biosynthesis of ethylene and sex expression in cucumber (*Cucumis sativus*). Plant Growth Regul. 5, 105-113.
- TREBITSH, T.; STAUB, J.E. und O'NEILL, S.D. (1997): Identifikation of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene linked to the female (*F*) locus that enhances female sex expression in cucumber. Plant Physiol. 113, 987-995.
- VICE-PRUCE, D. (1975): Photoperiodism in plants. McGraw-Hill, London.
- VURAL, I. (1999): Increasing of the One Hormone Hypothesis concerning the sex inheritance and sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). 6. Symposium der Deutsch-Türkischen Agrarforschung, 195-200.
- WEIGEL, D.; ALVAREZ, J. SMITH; D.R.; YANOSKY, M.F und MEYEROWITZ E.M. (1992): *Leafy* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. Cell 69, 843-859.
- WITTWER, S.H. und BUCOVAC, M.Y. (1958): The effect of gibberellin on economic crops. Econ. Bot. 12, 213-255.
- WITTWER, S.H. und BUCOVAC, M.Y. (1962): Staminate flower formation on gynoecious cucumber as influenced by the various gibberellins. Naturwissenschaften 49, 305-306.

- WOLTERING, E. J. (1990): Interorgan translocation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene coordinate senescence in emasculated *Cymbidium* flowers. *Plant Physiol.* 91, 837-845.
- WURGLER-MURPHY, S.M. und SAITO, H. (1997): Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochem. Sci.* 26, 172-176.
- YAMASAKI, S.; FUJII, N. und TAKAHASHI, H. (2000): The ethylene-regulated expression of *CS-ETR2* and *CS-ERS* genes in Cucumber plants and their possible involvement with sex expression in flowers. *Plant Cell Physiol.* 41 (5), 608-616.
- YAMASAKI, S.; FUJII, N.; SEIJI, M.; HIDEMASA, M. und TAKAHASHI, H. (2001): The *M* locus and ethylene-controlled sex determination in andromonoecious cucumber plants. *Plant Cell Physiol.* 42 (6), 608-619.
- YANG, S.F. (1969): Further studies on ethylene formation from 2-chloroethyl phosphonic acid. *Plant Physiol.* 44, 1203-1204.
- YANG, S.F. (1980): Regulation of ethylene biosynthesis. *Hort. Sci.* 15, 238-243.
- YANG, S.F. und HOFFMAN, N.E. (1984): Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 155-189.
- YANOFSKY, M.F.; MA, H.; BOWMANN, J.L.; DREWS, G.N.; FELDMANN, K.A. und MEYEROWITZ, E.M. (1990): The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* 346, 35-39.
- YANPOLSKY, C und YANPOLSKY, H (1922): Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genet.* 3, 179-62.
- YE-BO, P.; JI-CHEN, J.; YANG-LING, L.; YANG-ZHONG, H.; WANG-YONG, J. und CAO-ZONG, X. (2000): Studies on a gynoeocious-specific ACC synthase gene in different sexual phenotypes of cucumber genome. *Acta-Botanica-Sinica.* 42 (2), 146-168.
- YIN, T. und QUINN, J.A. (1992): A mechanistic model of single hormone regulating both sexes in flowering plants. *Bull. Torr. Bot. Cl.* 119, 431-441.
- YIN, T. und QUINN, J.A. (1995): Tests of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (*Cucurbitaceae*). *Am. J. Bot.* 82, 1537-1546.
- ZAREMBINSKY, T.I. and THEOLOGIS, A. (1993): Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Biol. Cell.* 4, 363-373.

7. Anhang

Anhang 7.1: Messungen der durchschnittlichen Nodienlänge bei unterschiedlichen Geschlechtstypen der genetischen Hintergründe WrD, ED und ECD

Tab. 7.1: Messergebnisse von gynözischen (*MM AcrAcr*) Pflanzen aus WrD.

Pflanzen-Nr.	ges. Länge der Pfl. [cm]	Anzahl der Nodien	durchs. Länge der Nodien [cm]
1	134	24	5,58
2	94	20	4,70
3	96	23	4,17
4	113	20	5,65
5	115	25	4,60
6	135	26	5,19
7	127	21	6,05
8	94	19	4,95
9	127	23	5,52
10	130	25	5,20
11	149	23	6,48
12	144	24	6,00
13	141	24	5,88
14	123	24	5,13
15	157	27	5,81
16	176	29	6,07
17	198	31	6,39
18	175	29	6,03
19	177	26	6,81
20	168	29	5,79
21	193	31	6,23
22	131	25	5,24
23	200	32	6,25
24	140	23	6,09
25	141	23	6,13
26	110	22	5,00
27	109	21	5,19
28	135	25	5,40
29	136	24	5,67
30	118	23	5,13
31	134	26	5,15

$\bar{\emptyset} = 5,60$

Tab. 7.2: Messergebnisse von gynözischen (*MM AcrAcr*) Pflanzen aus ED.

Pflanzen-Nr.	ges. Länge der Pfl. [cm]	Anzahl der Nodien	durchs. Länge der Nodien [cm]
1	90	19	4,74
2	110	19	5,79
3	100	19	5,26
4	136	26	5,23
5	151	24	6,29
6	110	22	5,00
7	115	21	5,48
8	120	23	5,22
9	105	18	5,83
10	125	24	5,21

$\bar{\emptyset} = 5,40$

Tab. 7.3: Messergebnisse von gynözischen (*MM AcrAcr*) Pflanzen aus ECD.

Pflanzen-Nr.	ges. Länge der Pfl. [cm]	Anzahl der Nodien	durchs. Länge der Nodien [cm]
1	89	20	4,45
2	141	23	6,13
3	126	23	5,48
4	103	19	5,42
5	107	21	5,10
6	82	19	4,32
7	78	21	3,71
8	167	29	5,76
9	117	22	5,32
10	178	23	7,74
11	142	22	6,45
12	162	24	6,75
13	139	27	5,15
14	118	21	5,62
15	92	20	4,60
16	100	20	5,00
17	121	23	5,26
18	118	19	6,21
19	93	20	4,65
20	112	22	5,09
21	128	23	5,57

$\bar{\emptyset} = 5,42$

Tab. 7.4: Messergebnisse von hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Pflanzen aus WrD.

Pflanzen-Nr.	ges. Länge der Pfl. [cm]	Anzahl der Nodien	durchs. Länge der Nodien [cm]
1	131	20	6,55
2	132	24	5,50
3	121	22	5,50
4	100	18	5,53
5	88	20	4,38
6	86	20	4,30
7	119	22	5,41
8	151	24	6,29
9	131	25	5,24
10	116	22	5,27
11	172	25	6,88
12	157	24	6,54
13	111	25	4,44
14	123	23	5,35
15	140	23	6,09
16	135	24	5,63
17	144	24	6,00
18	133	27	4,93

$\bar{\emptyset} = 5,55$

Tab. 7.5: Messergebnisse von hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Pflanzen aus ED.

Pflanzen-Nr.	ges. Länge der Pfl. [cm]	Anzahl der Nodien	durchs. Länge der Nodien [cm]
1	52	15	3,47
2	94	17	5,53
3	118	20	5,90
4	111	20	5,55
5	62	13	4,77
6	63	13	4,85
7	133	19	7,00
8	118	18	6,56
9	121	16	7,56
10	60	13	4,62
11	87	13	6,69
12	119	20	5,95

$\bar{\varnothing} = 5,68$

Tab. 7.6: Messergebnisse von hermaphroditischen (*mm AcrAcr*) Pflanzen aus ECD.

Pflanzen-Nr.	ges. Länge der Pfl. [cm]	Anzahl der Nodien	durchs. Länge der Nodien [cm]
1	75	15	5,00
2	97	18	5,39
3	90	17	5,29
4	106	17	6,24
5	95	20	4,75
6	113	19	5,95
7	138	19	7,26
8	88	15	5,87
9	59	20	2,95

$\bar{\varnothing} = 5,41$

Tab. 7.7: Messergebnisse von phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Pflanzen aus WrD.

Pflanzen-Nr.	ges. Länge der Pfl. [cm]	Anzahl der Nodien	durchs. Länge der Nodien [cm]
1	121	21	5,76
2	130	18	7,22
3	120	16	7,50
4	130	19	6,84
5	140	19	7,37
6	120	17	7,06
7	133	17	7,82
8	132	17	7,76

$\bar{\varnothing} = 7,17$

Tab. 7.8: Messergebnisse von phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Pflanzen aus ED.

Pflanzen-Nr.	ges. Länge der Pfl. [cm]	Anzahl der Nodien	durchs. Länge der Nodien [cm]
1	103	16	6,44
2	128	17	7,53
3	114	15	7,60
4	100	17	5,88
5	110	17	6,47
6	104	17	6,12
7	129	16	8,06
8	132	17	7,76
9	133	16	8,31

$\bar{\varnothing} = 7,13$

Tab. 7.9: Messergebnisse von phänotypisch andrözischen (*MM acracr*) Pflanzen aus ECD.

Pflanzen-Nr.	ges. Länge der Pfl. [cm]	Anzahl der Nodien	durchs. Länge der Nodien [cm]
1	108	15	7,20
2	119	17	7,00
3	106	15	7,07
4	103	16	6,44
5	157	20	7,85
6	118	15	7,87
7	102	17	6,00
8	133	18	7,39
9	152	18	8,44
10	154	19	8,11
11	132	18	7,33
12	107	20	5,35
13	75	15	5,00
14	148	18	8,22
15	178	18	9,89
16	114	15	7,60
17	105	17	6,18
18	131	17	7,71
19	123	18	6,83
20	130	16	8,13
21	133	19	7,00
22	134	21	6,38
23	100	17	5,88
24	102	15	6,80
25	80	16	5,00
26	111	16	6,94
27	97	15	6,47
28	161	19	8,47
29	122	16	7,63
30	130	18	7,22
31	136	16	8,50
32	93	15	6,20
33	171	22	7,77
34	108	18	6,00
35	96	12	8,00
36	142	18	7,89

$\bar{\varnothing} = 7,16$

Anhang 7.2 Boniturergebnisse der Pfropfungsversuche

Tab. 7.10: Boniturergebnisse nach der Pfropfung zwischen hermaphroditischen und gynözischen Pflanzen.

Pfropfungen	♀ MM AcrAcr			♀ MM AcrAcr			♀ MM AcrAcr			♀ mm AcrAcr			♀ mm AcrAcr			♀ mm AcrAcr		
	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂
gen. Hint. WrD																		
Nr.1	20	0	0	0	0	0	25	0	0	0	6	0	0	34	20	0	27	13
2	40	0	0	22	0	0	25	0	0	0	16	9	0	3	0	0	15	6
3	-	-	-	0	0	0	9	0	0	-	-	-	-	-	-	0	3	9
4	-	-	-	17	0	0	15	0	0	-	-	-	0	46	29	-	-	-
5	-	-	-	19	0	0	14	0	0	-	-	-	0	47	21	0	3	8
Σ	60	0	0	58	0	0	88	0	0	0	22	9	0	130	70	0	48	35
ED																		
Nr.1	25	0	0	11	0	0	13	0	0	-	-	-	0	16	8	0	6	1
2	26	0	0	8	0	0	5	0	0	-	-	-	0	22	17	0	0	6
3	-	-	-	4	0	0	13	0	0	-	-	-	0	25	13	0	5	6
4	-	-	-	9	0	0	2	0	0	-	-	-	0	14	19	-	-	-
5	-	-	-	14	0	0	-	-	-	-	-	-	0	31	36	-	-	-
Σ	51	0	0	46	0	0	33	0	0				0	108	93	0	11	13
ECD																		
Nr.1	16	0	0	12	0	0	12	0	0	0	32	7	0	28	23	0	14	9
2	23	0	0	24	0	0	6	0	0	0	54	14	0	53	19	0	7	2
3	-	-	-	16	0	0	13	0	0	-	-	-	0	70	17	0	0	2
4	-	-	-	18	0	0	7	0	0	-	-	-	0	46	8	0	9	4
5	-	-	-	14	0	0	6	0	0	-	-	-	0	119	16	0	7	1
Σ	39	0	0	84	0	0	44	0	0	0	86	21	0	316	83	0	37	18

Tab. 7.11: Boniturergebnisse nach der Pfropfung zwischen phänotypisch andrözischen und gynözischen Pflanzen. Darstellung des aus den weiblichen und männlichen Blüten (♀/♂) errechneten Quotienten erfolgt in Abb. 2.12.

Pfropfungen	♀ MM AcrAcr			♂ ♀ MM acracr			♂ ♀ MM acracr			♂ ♀ MM acracr			♀ MM AcrAcr			♀ MM AcrAcr		
	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂
gen. Hint. ECD																		
Blütentyp	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂	♀	♂	♀/♂
	26	0	-	28	80	0,35	1	56	0,017	6	205	0,029	39	0	-	13	0	-
	15	1	15	5	181	0,027	4	149	0,026	2	170	0,011	18	0	-	11	0	-
	28	0	-	2	130	0,015	2	108	0,018	0	169	0	35	0	-	17	0	-
	23	0	-	24	166	0,144	4	61	0,065	0	105	0	19	0	-	24	0	-
	54	2	27	32	41	0,78	1	111	0,009	7	97	0,072	35	0	-	15	0	-
	34	0	-	2	125	0,016	4	123	0,032	3	118	0,025	44	0	-	6	0	-
	40	2	20	33	101	0,326	0	107	0	9	136	0,066	26	0	-	17	0	-
	47	1	47	20	138	0,145	8	193	0,041	1	154	0,006	60	0	-	26	0	-
	20	0	-	14	18	0,777	5	190	0,026	3	161	0,018	42	0	-	12	0	-
	24	0	-	2	120	0,016	5	127	0,039	8	142	0,056	19	0	-	16	0	-
	15	0	-	0	152	0	2	114	0,017	0	167	0	27	0	-	24	0	-
	18	0	-	3	204	0,014	2	121	0,017	9	124	0,072	39	0	-	19	0	-
				65	109	0,596	0	81	0	5	133	0,037	36	0	-	16	0	-
				18	254	0,07	0	69	0	6	206	0,029	41	1	41	17	0	-
				5	152	0,032	3	91	0,032	13	192	0,067	27	0	-	8	0	-
				0	101	0	2	111	0,018	5	130	0,038	38	0	-	33	0	-
				3	191	0,015	3	154	0,019	11	187	0,058	61	0	-			
				1	162	0,006	5	122	0,04	1	119	0,008	26	0	--			
				1	117	0,008				0	35	0	62	2	31			
				11	95	0,115							50	3	16,66			
				4	113	0,035							39	0	-			
				2	135	0,017							31	0	-			
				25	55	0,454							19	2				
				3	209	0,014												
				7	142	0,049												
				0	72	0												
				1	112	0,008												
				27	183	0,147												
Σ	344	6	0	349	3662		51	2750		89	2751		833	8		274	0	

Anhang 7.3.1 Boniturergebnisse der Kupferbehandlung

Tab. 7.12: Darstellung der Boniturergebnisse verschiedener Geschlechtstypen nach der Applikation von Kupfer, Ethephon und AgNO₃.

Linie	Nummer	Behandlung	W	W + Z	W + Z + M	Z	W + M	Z + M	M	Nodien ohne Blüten	Anzahl Nodien
25402/m	1.	H ₂ O					1		23	1	25
männlich	2.								21		21
	3.								25	1	26
	4.								15	2	17
	5.										
Summe							1		84	4	89
Summe in %			0%	0%	0%	0%	1,1%	0%	94,4%	4,5%	
25405/H	1.	H ₂ O				4		6	2	1	13
hermaphroditisch	2.					11		14	2	1	28
	3.					7		17	1	2	27
	4.					7		15	2	1	25
	5.					4		18	2	2	26
SUMME						33		70	9	7	119
SUMME IN %			0%	0%	0%	27,8%	0%	58,9%	7,6%	5,7%	
25401/W	1.	H ₂ O	27						1	1	29
weiblich	2.		30						3	2	35
	3.		28							1	29
	4.		33							2	35
	5.		32							2	34
SUMME			150						4	8	162
SUMME IN %			92,6%	0%	0%	0%	0%	0%	2,5%	4,9%	
25402/m	6.	AgNO ₃ +	3				11	1	5	2	22
männlich	7.	Ethephon					3	7	8		18
	8.						17		2		19
	9.										
	10.										
Summe			3				31	8	15	2	59
Summe in %			5,1%	0%	0%	0%	52,6%	13,6%	25,4%	3,4%	
25405/H	6.	AgNO ₃ +				4		24		1	29
hermaphroditisch	7.	Ethephon		1		11		16		1	29
	8.					3		15	5	2	25
	9.										
	10.					12		14		3	29
Summe				1		30		69	5	7	112
Summe in %			0%	0,9%	0%	26,7%	0%	61,6%	4,5%	6,3%	

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite.

W: WEIBLICHES NODIUM

Z: HERMAPHRODITISCHES NODIUM

M: MÄNNLICHES NODIUM

Linie	Nummer	Behandlung	W	W + Z	W + Z + M	Z	W + M	Z + M	M	Nodien ohne Blüten	Anzahl Nodien
25401/W	6.	AgNO ₃ +	9	5	1		10			2	27
weiblich	7.	Ethephon	15				10		4	1	30
	8.		13				15			1	29
	9.		15	2			14			1	32
	10.		20	3			1			2	26
Summe			72	10	1		50		4	7	144
Summe in %			50 %	7%	0,7%	0%	34,6 %	0%	2,8%	4,9%	
25402/M	11.	AgNO ₃						1	28	1	30
männlich	12.							1	31	1	33
	13.							2	32	1	35
	14.								23		23
	15.										
Summe								4	114	3	121
Summe in %			0%	0%	0%	0%	0%	3,3%	94,2 %	2,5%	
25405/H	11.	AgNO ₃									
hermaphroditisch	12.							19	15	1	35
	13.							21	13	1	35
	14.							14	23	1	38
	15.							15	9	1	25
Summe								69	60	4	133
Summe in %			0%	0%	0%	0%	0%	51,8%	45,2 %	3%	
25401/W	11.	AgNO ₃	10	4			1		14	1	30
weiblich	12.		2	5		1		3	9	1	21
	13.		14	5			10	2	5	1	37
	14.		6	6	1	1	5	3	1	1	24
	15.		8	5	1		12	4	3	1	34
Summe			40	25	2	2	28	12	32	5	146
Summe in %			27,4%	171%	1,4%	1,4%	19,2 %	8,2%	21,9 %	3,4%	
25402/M	16.	CuSO ₄							27	5	32
männlich	17.						1		26	3	30
	18.										
	19.		2				1		39	2	44
	20.										
Summe			2				2		92	10	106
Summe in %			2%	0%	0%	0%	2%	0%	86,7 %	9,3%	
25405/H	16.	CuSO ₄				15		22	1	2	40
hermaphroditisch	17.					12		27	2	1	42
	18.					13		24	5	2	44
	19.					14		24	2	2	42
	20.					16		23		2	41
Summe						70		120	10	9	209
Summe in %			0%	0%	0%	33,4 %	0%	57,5%	4,8%	4,3%	

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite.

Linie	Nummer	Behandlung	W	W + Z	W + Z + M	Z	W + M	Z + M	M	Nodien ohne Blüten	Anzahl Nodien
25401/W	16.	CuSO ₄	42							1	43
weiblich	17.		41							3	44
	18.		40							3	43
	19.		41							3	44
	20.		42							3	45
Summe			206							13	219
Summe in %			94,1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	5,9%	
25402/M	21.	CuSO ₄ +					2		37	6	45
männlich	22.	AgNO ₃					1		40	3	44
	23.						1		37	4	42
	24.						1		40	2	43
	25.										
Summe							5		154	15	174
Summe in %			0%	0%	0%	0%	2,9%	0%	88,5%	8,6%	
25405/H	21.	CuSO ₄				1		41	2	1	45
hermaphroditisch	22.	+ AgNO ₃						21	22	1	44
	23.					2		33	7	3	45
	24.							39	3	2	44
	25.					1		28	12	2	43
Summe						4		162	46	9	221
Summe in %			0%	0%	0%	1,8%	0%	73,3%	20,8%	4,1%	
25401/W	21.	CuSO ₄	49							2	51
weiblich	22.	+ AgNO ₃	48							3	51
	23.		47							2	49
	24.		26							4	30
	25.		44							6	50
Summe			214							17	231
Summe in %			92,6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	7,4%	
25402/M	26.	CuSO ₄ +	6				13		12		32
männlich	27.	Ethephon	16				13		2		31
	28.		19				3		2	4	28
	29.		19				8		3		30
	30.										
Summe			60				37		19	4	121
Summe in %			49,5%	0%	0%	0%	31,4%	0%	15,8%	3,3%	
25405/H	26.	CuSO ₄ +		3		14				1	18
hermaphroditisch	27.	Ethephon		3		5				1	9
	28.			8		6				1	15
	29.			9		7		8		1	25
	30.			7		9		8		1	25
Summe				30		41		16		5	92
Summe in %			0%	32,6%	0%	44,6%	0%	17,4%	0%	5,4%	

Fortsetzung der Tabelle siehe nächste Seite.

Linie	Nummer	Behandlung	W	W + Z	W + Z + M	Z	W + M	Z + M	M	Nodien ohne Blüten	Anzahl Nodien
25401/W	26.	CuSO ₄ +	26							1	27
weiblich	27.	Ethephon	31							1	32
	28.		28							1	29
	29.		26							3	29
	30.		32							2	34
Summe			143							8	151
Summe in %			94,7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	5,3%	
25402/M	31.	Ethephon	12				12		4		28
männlich	32.		9				10		2		21
	33.		14				1			1	16
	34.		6				9		1		16
	35.										
Summe			41				32		7	1	81
Summe in %			50,6%	0%	0%	0%	39,5%	0%	8,6%	1,3%	
25405/H	31.	Ethephon		3	1	9		21	1		35
hermaphroditisch	32.			2		2		11		7	22
	33.					2		12	2	2	18
	34.		1	2	1	1		24	1	3	33
	35.			2		4		21	1	1	29
Summe			1	9	2	18		89	5	13	137
Summe in %			0,7%	6,6%	1,4%	13,1%	0%	65%	3,6%	9,6%	
25401/W	31.	Ethephon	15							10	25
weiblich	32.		29							1	30
	33.		34							1	36
	34.		34							2	36
	35.		22							1	23
Summe			134						1	15	150
Summe in %			90,0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	10%	

W: WEIBLICHES NODIUM
Z: HERMAPHRODITISCHES NODIUM
M: MÄNNLICHES NODIUM

Anhang 7.3.2: Ergebnisse der physiologischen Reaktion auf AgNO₃- ,Gibberellin und 1-MCP –Applikationen bei unterschiedlichem Alter

Tab. 7.13: Darstellung der Blütenverteilung unbehandelter gynösischer Pflanzen.

Gynösisch / Kontrolle

Nod. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%		
0	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,7		
w	10	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	453	99,3	
																																									456	100
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%
0	16,7	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7		
w	83,3	91,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,3		

w = weibliche Blüten; 0 = keine Blüten

Tab. 7.14: Darstellung der Blütenverteilung unbehandelter hermaphroditischer Pflanzen.

Hermaphroditisch / Kontrolle

Nod. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%			
0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,2		
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,2	
Z	11	12	11	10	7	6	6	6	6	6	7	5	5	6	5	7	8	8	6	8	9	8	10	10	10	10	10	11	11	11	11	11	12	12	12	12	12	12	12	12	342	75	
Z+m	-	-	1	2	5	6	6	6	6	6	5	7	7	6	7	5	3	4	6	4	3	4	2	2	2	2	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	112	24,6		
																																										456	100
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%
0	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2		
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	
Z	91,7	100	91,7	83,3	58,3	50	50	50	50	50	58,3	41,7	41,7	50	41,7	58,3	66,7	66,7	50	66,7	75	66,7	83,3	83,3	83,3	83,3	91,7	91,7	91,7	91,7	91,7	100	100	100	100	100	100	100	100	75			
Z+m	-	-	8,3	16,7	41,7	50	50	50	50	50	41,7	58,3	58,3	50	58,3	41,7	25,0	33,3	50	33,3	25	33,3	16,7	16,7	16,7	16,7	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	24,6			

m = männliche Blüten; z = zwittrige Blüten

Tab. 7.15: Darstellung der Blütenverteilung der im 2 Blattstadium mit AgNO₃ behandelten gynözischen Pflanzen.

Gynözisch / Ag NO₃ / 2 Blattstadium

Nod. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%	
o	7	4	3	3	2	2	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	5,7	
w	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	1	2	2	3	6	8	10	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	287	62,9
m	5	6	8	9	9	9	9	10	9	9	8	7	3	3	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	107	23,5
W+	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,7	
Z	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	3	3	7	6	4	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	7,2
																																								456	100
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%
o	58,3	33,3	25	25	16,7	16,7	16,7	8,3	8,3	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7		
w	-	-	-	-	8,3	8,3	8,3	-	-	-	8,3	16,7	16,7	25	50,0	66,7	83,3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	62,9	
m	41,7	50	66,7	75	75	75	75	83,3	75	75	66,7	58,3	25	25	16,7	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23,5		
W+	-	16,7	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7		
Z	-	-	-	-	-	-	-	8,3	16,7	16,7	25	25	58,3	50	33,3	25,0	16,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,2	

Tab. 7.16: Darstellung der Blütenverteilung der im 2 Blattstadium mit AgNO₃ behandelten hermaphroditischen Pflanzen.

Hermaphroditisch / Ag NO₃ / 2 Blattstadium

Nod. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%	
m	8	2	2	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	3,6	
z	2	3	6	9	8	9	9	10	10	10	9	8	4	3	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	102	24,3
Z+m	1	2	1	2	-	-	1	-	-	1	-	-	4	5	6	7	7	7	8	8	9	10	9	9	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	251	59,9	
Z+m	4	2	-	2	2	-	1	1	-	1	3	3	3	4	4	4	4	4	3	3	2	1	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51	12,2
																																								419	100
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%
o	72,7	18,2	18,2	-	9,1	-	9,1	-	-	-	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6		
m	18,2	27,3	54,5	81,8	72,7	81,8	81,8	90,9	90,9	90,9	81,8	72,7	36,4	27,3	9,1	-	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24,3		
z	9,1	18,2	9,1	18,2	-	-	9,1	-	-	9,1	-	-	36,4	44,5	54,5	63,6	63,6	63,6	72,7	72,7	81,8	90,9	81,8	81,8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	59,9		
Z+m	-	36,4	18,2	-	18,2	18,2	-	9,1	9,1	-	9,1	27,3	27,3	27,3	36,4	36,4	36,4	36,4	27,3	27,3	18,2	9,1	18,2	18,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,2		

Tab. 7.17: Darstellung der Blütenverteilung der im 8 Blattstadium mit AgNO₃ behandelten gynözischen Pflanzen.

Gynözisch / Ag NO₃ / 8 Blattstadium

Nod Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%	
0	4	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	2,6	
w	6	8	8	9	10	10	8	7	6	6	2	1	-	1	1	1	2	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	4	5	5	6	6	7	7	7	140	41,1	
m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	4	4	7	6	3	2	2	2	1	1	1	1	-	-	-	-	-	39	11,4
w+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	3	3	3	3	2	2	4	4	4	4	2	1	1	-	-	-	-	-	38	11,1
z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	2	2	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	16	4,7	
z+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	4	4	3	4	5	6	7	7	5	4	3	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	59	17
w+z	-	-	-	-	-	-	2	3	4	2	5	5	4	3	2	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-	40	11,7	
w+z+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	3,2
																																							341	100	
																																								%	
0	40	20	20	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41,1		
w	60	80	80	90	100	100	80	70	60	60	20	10	-	10	10	10	20	20	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	12,5	12,5	50	62,5	62,5	75	75	87,5	87,5	87,5	11,4	
m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	30	40	40	70	75	37,5	25	25	25	12,5	12,5	12,5	12,5	-	-	-	-	-	11,1	
w+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	30	30	30	30	20	25	50	50	50	50	25	12,5	12,5	-	-	-	-	-	4,7	
z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	20	20	20	20	30	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	12,5	12,5	17	
z+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	40	40	30	40	50	60	70	70	50	40	30	30	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	11,7	
w+z	-	-	-	-	-	-	20	30	40	20	50	50	40	30	20	20	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	-	-	-	3,2	
w+z+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	20	20	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	12,5	12,5	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tab. 7.18: Darstellung der Blütenverteilung der im 8 Blattstadium mit AgNO₃ behandelten hermaphroditischen Pflanzen.

Hermaphroditisch / Ag NO₃ / 8 Blattstadium

Nodi. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%		
0	5	2	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	2,6	
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	3	4	7	7	10	11	11	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	179	42,8
Z	6	6	7	7	7	8	7	5	5	5	3	3	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	-	1	-	1	2	82	19,6		
z+m	-	3	2	3	3	3	4	6	6	6	8	8	8	8	10	10	10	10	10	8	7	4	4	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	-	146	34,9	
																																							418	100		
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%	
0	45,5	18,2	18,2	9,1	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6		
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	27,3	36,4	63,6	63,6	90,9	100	100	90,9	90,9	90,9	90,9	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	42,8		
Z	54,5	54,5	63,6	63,6	63,6	72,7	63,6	45,5	45,5	45,5	27,3	27,3	27,3	18,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,1	9,1	9,1	9,1	-	9,1	-	9,1	18,2	19,6			
z+m	-	27,3	18,2	27,3	27,3	27,3	36,4	54,5	54,5	54,5	72,7	72,7	72,7	72,7	90,9	90,9	90,9	90,9	72,7	63,6	36,4	36,4	9,1	-	-	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	18,2	9,1	18,2	9,1	-	34,9			

Tab. 7.19: Darstellung der Blütenverteilung der im 2 Blattstadium mit Gibberellin behandelten gynözischen Pflanzen.

Gynözisch / Gibberellin / 2 Blattstadium

Nodi. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%	
0	10	9	5	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29	6,4
W	2	3	7	8	10	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	424	93
M	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,2
w+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,4	
Σ																																							456	100	
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%
0	83	75	41,7	33,3	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,4	
W	17	25	58,3	66,7	83,3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	91,7	100	100	100	100	100	91,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93	
M	-	-	-	-	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	
w+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3	-	-	-	-	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	

Tab. 7.20: Darstellung der Blütenverteilung der im 2 Blattstadium mit Gibberellin behandelten hermaphroditischen Pflanzen.

Hermaphroditisch / Gibberellin / 2 Blattstadium

Nod. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%	
0	11	8	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	4,8	
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,7
Z	1	4	10	12	11	11	12	11	10	11	8	11	8	9	9	8	8	6	6	8	8	10	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	383	84,0
z+m	-	-	-	-	-	1	-	1	2	1	4	1	4	3	3	4	4	5	5	3	4	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48	10,5
Σ																																							456	100	
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%	
0	91	66,7	16,7	-	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,8		
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3	8,3	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7		
H	83	33,3	83,3	100	91,7	91,7	100	91,7	83,3	91,7	66,7	91,7	66,7	75	75	66,7	66,7	50	50	66,7	66,7	83,3	91,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	84	
z+m	-	-	-	-	-	8,3	-	8,3	16,7	8,3	33,3	8,3	33,3	25	25	33,3	33,3	41,7	41,7	25	33,3	16,7	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,5	
																																							100		

Tab. 7.21: Darstellung der Blütenverteilung der im 8 Blattstadium mit Gibberellin behandelten gynözischen Pflanzen.

Gynözisch / Gibberellin / 8 Blattstadium

Nod. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%	
0	11	8	6	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	6,2	
W	-	3	5	11	10	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	392	93,8
Σ																																								418	100
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%
0	100	72,7	54,5	-	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,2	
W	-	27,3	45,5	100	90,9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93,8	

Tab. 7.22: Darstellung der Blütenverteilung der im 8 Blattstadium mit Gibberellin behandelten hermaphroditischen Pflanzen.

Hermaphroditisch / Gibberellin / 8 Blattstadium

Nod. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%		
0	11	10	7	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	7,7	
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	3	3	5	5	6	5	6	4	5	3	4	4	2	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	62	13,6	
Z	1	2	5	8	9	12	11	12	11	11	9	10	8	6	3	2	2	1	1	1	-	-	-	1	3	3	4	7	7	7	9	10	11	12	12	12	12	12	247	54,2		
z+m	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	3	2	4	5	8	7	7	6	6	5	7	6	8	6	6	5	4	3	3	3	2	2	1	-	-	-	-	-	-	112	24,6	
Σ																																									456	100
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%
0	91,7	83,3	58,3	33,3	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,7		
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3	8,3	25	25	41,7	41,7	50	41,7	50	33,3	41,7	25	33,3	33,3	16,7	16,7	16,7	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	13,6		
Z	8,3	16,7	41,7	66,7	75	100	91,7	100	91,7	91,7	75	83,3	66,7	50	25	16,7	16,7	8,3	8,3	8,3	-	-	-	8,3	25	25	33,3	58,3	58,3	58,3	75	83,3	91,7	100	100	100	100	100	54,2			
z+m	-	-	-	-	-	-	8,3	-	8,3	8,3	25	16,7	33,3	41,7	66,7	58,3	58,3	50	50	41,7	58,3	50	66,7	50	50	41,7	33,3	25	25	25	16,7	16,7	8,3	-	-	-	-	-	24,6			

Tab. 7.25: Darstellung der Blütenverteilung der im 4,5 Blattstadium mit 1-MCP behandelten gynözischen Pflanzen.

Gynözisch / 1-MCP / 4,5 Blattstadium

Nod. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%		
0	4	3	2	3	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	6,4	
W	3	4	2	3	4	6	3	3	4	7	5	3	4	5	7	7	6	6	5	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	220	82,7
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1,1
w+m			3	1	-	-	3	4	3	-	1	4	2	1	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	9,8
Σ																																									266	100
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%
0	57,1	42,9	28,6	42,9	42,9	14,3	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,4	
W	42,9	57,1	28,6	42,9	57,1	85,7	42,9	42,9	57,1	100	71,4	42,9	57,1	71,4	100	100	85,7	85,7	71,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	82,7	
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,3	-	14,3	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	
w+m	-	-	42,9	14,3	-	-	42,9	57,1	42,9	-	14,3	57,1	28,6	14,3	-	-	14,3	14,3	28,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,8	

Tab. 7.26: Darstellung der Blütenverteilung der im 8 Blattstadium mit 1-MCP behandelten gynözischen Pflanzen.

Gynözisch / 1-MCP / 8 Blattstadium

Nod. Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	Σ	%			
0	5	3	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	5,7	
W	1	3	3	4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	212	93,0
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	
w+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1,3	
Σ																																									100		
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	Σ%	
0	83,3	50	50	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7		
W	16,7	50	50	66,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83,3	66,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93,0		
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	
w+m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	

Anhang 7.4: Ergebnisse der Testkreuzungen der Ausgangslinien innerhalb der genetischen Hintergründe WrD und ED

Tab. 7.27 : Nachkommenschaften der Testkreuzungen des genetischen Hintergrundes WrD.

Kreuzung ^x	Kreuzung Nr.	Aufspaltung			Verhältnis	χ^2
		♀	(♂)♀	♂		
def. gynözisch ♀ X monözisch ♂♀ aus F ₁ (♂♀ x ♀)	A1	4	4	--	1:1	0
	A2	6	4	--	1:1	0,4
	A3	7	9	--	1:1	0,25
	Σ A	17	17	--	1:1	0
gynözisch ♀ aus F ₁ (♂♀ x ♀) X def. gynözisch ♀ ^y	B1	8	--	--	--	--
	B2	8	--	--	--	--
	B3	8	--	--	--	--
	Σ B	24	--	--	--	--
gynözisch ♀ aus F ₂ (♂♀ x ♀) X def. gynözisch ♀ ^y	C1	8	--	--	--	--
	C2	8	--	--	--	--
	C3	8	--	--	--	--
	Σ C	24	--	--	--	--
def. gynözisch ♀ X andrözisch ♂ aus F ₂ (♂♀ x ♀)	D1	2	12	--	1:3	0,857
	D2	3	12	--	1:3	0,2
	D3	2	13	--	1:3	1,089
	D4	2	13	--	1:3	1,089
	Σ D	9	50	--	1:3	
def. gynözisch ♀ X monözisch ♂♀ aus F ₂ (♂♀ x ♀)	E1	10	6	--	1:1	1,0
	E2	28	31	--	1:1	0,153
	E3	32	27	--	1:1	0,4,24
	E4	9	4	--	1:1	1,923
	Σ E	79	68	--	1:1	
def. gynözisch ♀ X andrözisch ♂ aus ♂♀ x S	F1	--	9	--	--	--
	F2	--	14	--	--	--
	Σ F		23	--	--	--
def. gynözisch ♀ X monözisch ♂♀ aus ♂♀ x S	G1	7	5	--	1:1	0,333
	G2	8	5	--	1:1	0,692
	Σ G	15	10	--	1:1	

Σ = Summe von zwei bis vier Kreuzungsnachkommenschaften nach einem Homogenitätstest (SACHS 1978).

^x : weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.3, 3.4 und 3.5 in Kapitel 3.2.2)

^y : bei diesen Pflanzen wurden mit AgNO₃ männliche Blüten induziert.

Tab. 7.28: Nachkommenschaften der Testkreuzungen des genetischen Hintergrundes ED.

Kreuzung ^x	Kreuz.- Nr.	Aufspaltung			Verhältnis	χ^2
		♀	(♂)♀	♂		
def. gynözisch ♀ X monözisch ♂ ♀ aus F ₁ (♂ ♀ x ♀)	A1	5	5	--	1 : 1	0
	A2	4	6	--	1 : 1	0,4
	A3	3	6	--	1 : 1	1,0
	Σ A	12	17	--	1 : 1	
gynözisch ♀ aus F ₁ (♂ ♀ x ♀) X def. gynözisch ♀ ^y	B1	6	--	--	--	--
	B2	8	--	--	--	--
	B3	5	--	--	--	--
	Σ B	19	--	--	--	--
gynözisch ♀ aus F ₂ (♂ ♀ x ♀) X def. gynözisch ♀ ^y	C1	5	6	--	--	--
	C2	4	3	--	--	--
	Σ C	9	9	--	1 : 1	--
def. gynözisch ♀ X andrözisch ♂ aus F ₂ (♂ ♀ x ♀)	D	(1)	21	--	--	--
	D	--	23	--	--	--
	D	--	14	--	--	--
	Σ D	(1)	58	--	--	--
	D	3	10	--	1 : 3	0,857
def. gynözisch ♀ X monözisch ♂ ♀ aus F ₂ (♂ ♀ x ♀)	E	10	6	--	1 : 1	1,0
	E	8	4	--	1 : 1	1,333
	E	5	8	--	1 : 1	0,692
	E	8	5	--	1 : 1	0,692
	Σ E	31	23	--	1 : 1	
def. gynözisch ♀ X andrözisch ♂ aus ♂ ♀ x S	G1	2	12	--	1 : 3	0,857
	G2	2	12	--	1 : 3	0,857
	Σ G	7	35	--	1 : 3	
	G2	--	20	--	--	--
def. gynözisch ♀ X monözisch ♂ ♀ aus ♂ ♀ x S	H2	15	(1)	--	--	--
	H3	16	(1)	--	--	--
	Σ H	31	(2)	--	--	--
	H1	7	7	--	1 : 1	0

Σ = Summe von zwei bis vier Kreuzungsnachkommenschaften nach einem Homogenitätstest (SACHS 1978).

^x : weitere Erläuterungen siehe Abb. 3.3, 3.4 und 3.5 in Kapitel 3.2.2)

^y : bei diesen Pflanzen wurden mit AgNO₃ männliche Blüten induziert.

<i>CsACS5</i>	CTACCAACTCCCTACTATCCAGGATTCGATAGAGACTTGAAATGGAGAACTGGAATTGAG	360
<i>CsACS1</i>	CTCCCAACTCCATACTATCCAGGATTTGATAGAGATTTGAAATGGAGAACCGGAGTTGAG ** *****	477
<i>CsACS5</i>	ATCGTACCCATCCACTGCTCCAGCTCCAATGGCTTCAAAAATAACAGAATCAGCATTGTTA	420
<i>CsACS1</i>	ATTGTGCCAATTCATTGCACTAGCTCCAACGGCTTCCAAGTCACCCAACCAGCTTTAGAA ** ** *	537
<i>CsACS5</i>	GAAGCCTACCAAAACGCCTTAAATTGTAACCTCAAAGTCAAAGGCGTACTTGTGTACGAAC	480
<i>CsACS1</i>	CAAGCCTATCAAGAAGCCCAAGCTCGCAACCTACGTGTCAAAGGCGTATTGGTTACCAAC ***** *	597
<i>CsACS5</i>	CCATCGAACCCATTAGGAACCACAATCAGTAGTCACGAACTCAACCTCCGACTTCAATTC	540
<i>CsACS1</i>	CCATCTAACCCATTGGGAACCACAATGACAAGAAATGAACTCGACTTGGTTTTTTGATTTTC ***** ***** *	657
<i>CsACS5</i>	ATCGAATCAAAAAACCTCCATCTAATCAGCGACGAGATTTACTCTGGCACAGCTTTCCGA	600
<i>CsACS1</i>	ATAACCTCCAAAGGCATTCATTTGATCAGCGACGAGATTTACTCTGGGACCGTTTTTTGGG ** *	717
<i>CsACS5</i>	AACTCGGGTTTTGTGTCAGTGCCATGGAAATCCTTAACCAAAACATACAAAACACAACCACCAA	660
<i>CsACS1</i>	TCTCCAGGATTCGTGAGCGCCATGGAGGTGCTTAAGGAGAGGAGTAACGAAGACGAGGAA *	777
<i>CsACS5</i>	ATCCAAAATCAAGTTTCACATTGTTTACAGCCTCTCCAAAGATCTTGGCCTGCCCGGGTTC	720
<i>CsACS1</i>	GTTTGGGAAGAGAGTTTCATATTGTTTACAGTTTATCAAAGGATTTAGGGCTCCAGGTTTT *	837
<i>CsACS5</i>	CGAGTCGGAGCCTTATATTGCAATGACAAAAGTAGTAGTGGCTGCAGCGACAAAGATGTTCG	780
<i>CsACS1</i>	CGAGTTGGTGCAATTTACTCTAATGATGAAATGGTCGTGGCGGCTGCTACTAAAATGTCT ***** *	897
<i>CsACS5</i>	AGCTTTGGATTGGTTTTCGTCACAAACGCAGTACCTTCTGTGCGCGATGTTGTCAGACAAG	840
<i>CsACS1</i>	AGCTTTGGGTTGGTGTTCATCACAAACACATTATCTTCTTTTCAGCTATGCTATCCGACAAG ***** ***** *	957
<i>CsACS5</i>	AAGTTTAGGAGGAAGTACATTAGAAAAGAACAAAAGAGGTTGGAGAAAAGACAGACAATG	900
<i>CsACS1</i>	AAATTTACGAGAACCTATATTTCTGAGAATCAAAGAGGTTGAAAACAAAGACAGAAAATG ** ***** *	1017
<i>CsACS5</i>	CTGGTGAATGGGCTGGAGAAGGCGGGGATTAAGTGCCACAAAGGGAATGCAGGGCTTTTTT	960
<i>CsACS1</i>	TTGGTGAAGTGGATTAGAGAAGGCTGGGATTAAGTGTTTGGAGAGTAGTGTGGGTTGTTT ***** *	1077
<i>CsACS5</i>	TGCTGGGTGGATATGAGGCATTTGTTGGGAGGCAATACGTTTGAGTCAGAAAATGGAGCTT	1020
<i>CsACS1</i>	TGTTGGGTTGATATGAGGCATTTGTTGGAATCAGATACGTTTGAAATGTGAATTAAGCTA ** ***** ***** *	1137
<i>CsACS5</i>	TGGAGGAAGATTCTATTCGAGGTGCGCTTGAACGTGTACCCGGACAGTCATGCCATTGC	1080
<i>CsACS1</i>	TGGAAGAAGATTGTTTACGAAGTGGGTTTGAATATTTACCAGGATCATCTTGTTCATTGC ***** ***** *	1197
<i>CsACS5</i>	TCCGAACCAGGTTGGTTCAGCGTCTGCTT-GCCAA-----	1114
<i>CsACS1</i>	ACTGAACCAGGCTGGTTTTCGTGTGTTGTTTGTCTAATATGTCACAATCAACCTTGAAACTC * ***** ***** *	1257

Abb.7.3: Darstellung des Homologievergleichs der partiellen mRNA des Gens *CsACS5* mit der mRNA des Gens *CsACS1*.

Anhang 7.6 Homologievergleiche der in weiblichen Blüten zusätzlichen detektierten DDRT-PCR Fragmente (Primersequenz grau hinterlegt)

Fragmentnummer= 11; Größe = 185bp (cDNA Pool 1)

5`TAAACTCCGTCGATAGTATTTGTTGATAAAAATCAATCTTTCTCTTGTTGATTAATTCTATATGAAAGCTCAAT
TACATATAGAATTATTCAATTGTCATTTGATGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGAAAAGAGGAAAAGGAAAAAGGA
AAGGAAAAGGAAAAGGAAAGGTCTGGGGACGGAGTTT 3`

Fragmentnummer= 583; Größe = 116bp(cDNA Pool 12)

5`AAACTCCGTCGATAGTATTTGTTGATAAAAATCAATCTTTCTCTTGTTGATTAATTCTATATGAAAGCTCAATT
ACATATAGAATTATTCAATTGTCATTTGATGTAAAAAAAAAAAAA 3`

```
11      TAAACTCCGTCGATAGTATTTGTTGATAAAAATCAATCTTTCTCTTGTTGATTAATTCTAT 60
583    -AAACTCCGTCGATAGTATTTGTTGATAAAAATCAATCTTTCTCTTGTTGATTAATTCTAT 59
      *****
```

```
11      ATGAAAGCTCAATTACATATAGAATTATTCAATTGTCATTTGATGAAAAAAAAAAAAAAAA 120
583    ATGAAAGCTCAATTACATATAGAATTATTCAATTGTCATTTGATGTAAAAAAAAAAAA--- 116
      *****
```

```
11      AAAAGAGAAAAGAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGTCTGGGGACGGAGTTT 185
583    -----
```

Abb. 7.5: Homologievergleich (a) der cDNA Fragmente 11 und 583 (siehe Tab. 4.10 in Kapitel 4.3.1.2).

Fragmentnummer= 17,1 und 17,2; Größe = 155bp(cDNA Pool 1)

5`TCGGTCATAGGTAATTACCAATCCATACACTCTACCAACATGGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTT
AGTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAGCTTCGACTGAAAAA
AAAAAA 3` (Fragment 17.1 und 17.2 sind identisch)

Fragmentnummer= 101; Größe = 290bp (cDNA Pool 2)

5`GATCTAAGGCGGTGAAATTTGAGATAGAAGCACTGTCTGTGCACAATATTTTCATTTTTGTCCGACGAGTATTT
ACCATCCAAAATTGAAAGTGAACCTAACACTGTTGAACTCATAGGTAATTACCAATCCATACACTCTACCAACATG
GGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTTAGTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAAT
TACAATACTAAACCCAGCTTCGTCTTAACCCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAA 3`

Fragmentnummer= 217; Größe = 149bp(cDNA Pool 5)

5`TGAACCAATCCATACACTCTACCAACATGGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTTAGTATAAAAAAC
TCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAGCTTCGACTTAACCAATCAAAAAAAAA
A 3`

Fragmentnummer= 241; Größe = 207bp(cDNA Pool 5)

5`GATCTGACACTGTTGAACTCATAGATAATTACCAATCCATACACTCTACCAACATGGGGTTGATTTGGAACCG
TAATGGAATGAGTTAGTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAG
CTTCGACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGAAAAGAAAAGAACATCAGATGTGTCAGATCA 3`

Fragmentnummer= 477; Größe = 141bp(cDNA Pool 10)

5`TGAACCAATCCATACACTCTACCAACATAGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTTAGTATAAAAAAC
TCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAGCTTCGACTTAAAAAAAAAAAAA 3`

Fragmentnummer= 513.1 und 513.2; Größe = 232bp(cDNA Pool 10)

5`GATCTGACTGTGCACAATATTTTCATTTTTGTCCGACGAGTATTTACCATCCAAAATTGAAAGTGAACCTAACAC
TGTTGAACTCATAGGTAATTACCAATCCATACACTCTACCAACATGGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAG
TTAGTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAGCTTCGACCTAAA
AAAAAAA 3` (Fragment 513.1 und 513.2 sind identisch)

```

101 GATCTAAGGCGGTGAAATTTGAGATAGAAGCACTGTCTGTGCACAATATTTTCATTTTGT 60
513 -----GATCTGACTGTGCACAATATTTTCATTTTGT 31
217 -----
477 -----
17 -----
241 -----

101 CCGACGAGTATTTACCATCCAAAATTGAAAGTGAACCTAACACTGTTGAACTCATAGGTAA 120
513.1 CCGACGAGTATTTACCATCCAAAATTGAAAGTGAACCTAACACTGTTGAACTCATAGGTAA 91
217 -----TG 2
477 -----TG 2
17 -----TCGG--TCATAGGTAA 14
241 -----GATCTGACACTGTTGAACTCATAGATAA 28

101 TTACCAATCCATACACTCTACCAACATGGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTTA 180
513 TTACCAATCCATACACTCTACCAACATGGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTTA 151
217 GAACCAATCCATACACTCTACCAACATGGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTTA 62
477 GAACCAATCCATACACTCTACCAACATAGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTTA 62
17 TTACCAATCCATACACTCTACCAACATGGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTTA 74
241 TTACCAATCCATACACTCTACCAACATGGGGTTGATTTGGAACCGTAATGGAATGAGTTA 88
*****

101 GTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTACAATACTAAACCCAG 240
513 GTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAG 211
217 GTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAG 122
477 GTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAG 122
17 GTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAG 134
241 GTATAAAAAACTCATATTTGGATCAAATGTTTTTGGATCCAATTTATAATACTAAACCCAG 148
*****

101 CTTTCGTCTTAACCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAA----- 290
513 CTTTCGACCTAAAAAAAAAAAA----- 232
217 CTTTCGACTTAACCATCAAAAAAAAAAAAA----- 149
477 CTTTCGACCTAAAAAAAAAAAA----- 142
17 CTTTCGACTGAAAAAAAAAAAA----- 155
241 CTTTCGACTCAAAAAAAAAAAAAAAGAAGAAAAGAAAAGAACATCAGATGTGTCAGATCA- 207
***** * ** * *****

```

Abb. 7.6: Homologievergleich (b) der cDNA Fragmente 17, 101, 217, 241, 477 und 513 (siehe Tab. 4.10 in Kapitel 4.3.1.2).

Homologievergleich (c)

Fragmentnummer= 19; Größe = 121bp (cDNA Pool 1)

5`TTTTTTTTTTTTCAGTAGGATCAAGGTCTTTATTTAGTATTTGAAAGTTTGACGATATCCAAACCTTCAATTTA
ATTTTCTTAAACTAGGAAAAAAAAAACTTTATGATTTGAAAAAAAAAAAA 3`

Fragmentnummer= 103; Größe = 122bp (cDNA Pool 1)

5`TTTTTTTTTTTTCGGTAGGATCAAGGTCTTTATTTAGTATTTGAAAGTTTGACGATATCCAAACCTTCAATTT
AATTTTCTTAAACTAGGAAAAAAAAAACTTTATGATTTGAAAAAAAAAAAA 3`

```

103 TTTTTTTTTTTTTCGGTAGGATCAAGGTCTTTATTTAGTATTTGAAAGTTTGACGATATCC 60
19 -TTTTTTTTTTTTCAGTAGGATCAAGGTCTTTATTTAGTATTTGAAAGTTTGACGATATCC 59
*****

103 AAACCTTCAATTTAATTTTCTTAAACTAGGAAAAAAAAAACTTTATGATTTGAAAAAAAAAAAA 122
19 AAACCTTCAATTTAATTTTCTTAAACTAGGAAAAAAAAAACTTTATGATTTGAAAAAAAAAAAA 121
**** *****

```

Abb. 7.7: Homologievergleich (c) der cDNA Fragmente 19 und 103 (siehe Tab. 4.10 in Kapitel 4.3.1.2).

Fragmentnummer= 91.1; Größe = 132bp (cDNA Pool 2)
 5`TGATCAATCGCCATTAATGCAGATCTTTAATTTAAACTCATTCTATCCGATTGAAGATTGAAGAGAAACTTTT
 CCGGAAAATCGATTGGTATTTCCGGATTCATAGTGTGCATTACTGTGCGAAAAAAAAAAAA 3`

Fragmentnummer= 91.2; Größe = 281bp (cDNA Pool 2)
 5`TGATCAATCGCCATTAATGCAGATCTTTAATTTAAACTCTTTCTATCCGATTGAAGATTGAAGAGAAACTTTT
 CCGGAAAATCGATTGGTATTTCCGGATTCATAGTGTGCATTGCTGTGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAGAAAT
 ACAAACACCCTTTCTTTTCTTCCCCTTATTATTTCCCCTTATTTAAGAATGTCACCTCACCCACAAGAAAATTGGC
 AAAAAGGTCATTTCTTTGGGTGACAGTTTTTTGAGGCCCTTTTCCCGAAAAAAAAAAAA 3`

91.1 TGATCAATCGCCATTAATGCAGATCTTTAATTTAAACTCATTCTATCCGATTGAAGATTG 60
 91.2 TGATCAATCGCCATTAATGCAGATCTTTAATTTAAACTCTTTCTATCCGATTGAAGATTG 60

91.1 AAGAGAAACTTTTCCGGAAAATCGATTGGTATTTCCGGATTCATAGTGTGCATTACTGTC 120
 91.2 AAGAGAAACTTTTCCGGAAAATCGATTGGTATTTCCGGATTCATAGTGTGCATTGCTGTC 120

91.1 GAAAAAAAAAAAA----- 132
 91.2 GAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAAATACAAACACCCTTTCTTTTCTTCCCCTTATTAT 180

91.1 -----
 91.2 TTCCCCTTATTTAAGAATGTCACCTCACCCACAAGAAAATTGGCAAAAAGGTCATTTCTTT 240

Abb. 7.8: Homologievergleich (d) der cDNA Fragmente 91,1 und 91,2 (siehe Tab. 4.10 in Kapitel 4.3.1.2).

cDNA Pool 1

Fragmentnummer= 5; Größe = 85bp

5`TCTTTCTACCCAACCTTCATGGATTATTTTTGAACATTTGAAGATTATATGAATGTTCAAAATCTTTGCAAGT
 GAAAAAAAAAAAA 3`

Fragmentnummer= 29; Größe = 114bp

5`GATCTAAGGCCTTAAATGGAAAGATGTGGATCTTAATCGTGGAGTCATTACTCTGCATGAAACAAAAACGGT
 GAACGCCGATTTTTGCCTTTGGTTAGTCATGCCTTAGATCA 3`

cDNA Pool 2

Fragmentnummer= 93; Größe = 127bp

5`TGATCTAACCGTATTTCTAGTTCTGTTGATCCAGCATTGATTGTAGCTTTGATTGTTATATCTTTGATGGA
 CGAATATAACAAATGTGAACGAGTATTACGAAGTTATTATTCGAAAAAAAAAAAA 3`

Fragmentnummer= 103; Größe = 122bp

5`TTTTTTTTTTTTCGGTAGGATCAAGGTCTTTATTTAGTATTTGAAAGTTTTGACGATATCCAACTTTCAATTT
 AATTTCTTAAACTAGGAAAAAAAAAATTTATGATTGCGAAAAAAAAAAAA 3`

cDNA Pool 3

Fragmentnummer= 129; Größe = 114bp

5`GTTTTTCGCAGTATGGAATATGAAATGATTGTCAAAGACGTTTTTTGACACTTTTGTCTGAACATTTAAAGTT
 TCTTAATTGAGCTTCTTGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3`

cDNA Pool 4

Fragmentnummer= 201; Größe = 106bp

5`TGATCTGACTGGTTGTTTGTGTTTTCAATGAATCTGAATTTGAGCAGTTGATTGAAATTCAGAAT
 TTTAAAAGCTATGCGGTACCAGAAAAAAAAAAAA 3`

cDNA Pool 5

Fragmentnummer= 211; Größe = 218bp

5`TGGATTGGTCTACACTTTCTGCGCTATTGGGAGTAACATCATCCTCTCCCCCGGATATCAGGAACAATTAT
 ATTATTATTAATAATAATAATAATAAATTGTTCTGATATCGGATTAATTACTATCTTTATGTAATTATTAATATC
 GATGAATACTATTAATTTTTATTATGTCTATTAATATTAATAATAATAATAAATTGTTCTCTGACCAATCCAA 3`

Fragmentnummer= 243; Größe = 132bp

5`GATCTCAGACCTGTGTTTGTAGTCGTGGGTACACGGTGCAAAAAGTGCAGTTATTTTTCTTAAAGCGCGTAACT
 TAAGAAAACATTTGCACGGAAATAGAAAAGACTAGGACAGAAGTGTGTCAAAAAAAAAAAA 3`

Fragmentnummer= 247; Größe = 194bp

5`GATCAATCGCTCGTTGATATGCTAAAGCCGCAAATAACAAAATATGTGGGCGGGGAGATAAAAAAGAAAGCATT
ATGAATAAGAAAAATTGAAATTGAAATCCTCAAAAAAAGGAAAAAACCCTTATTTGTTTAACTTAGGGTCTG
TGCTGAAAAGGAAGAAGAAGAGGGGATGGCCATGGCGATTGATCA 3`

Fragmentnummer= 255; Größe = 128bp

5`GATCATGGTCACATTACAAATTTAAAGAAAAGAAGGAAAAAACAAGATGGGGAAAAATTGTTGGGGAAA
ACAAAACCTATCTCTACTAGTAATAAAATTTCAAGAACTTTATGACCATGATCA 3`

cDNA Pool 6

Fragmentnummer= 295; Größe = 193bp

5`TGATCTCAGACCAGGAAAAGCAAAGGCCAATTCGGATTTGGCCNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AGAATAATTGCAATTATTTATTGATCTCAGACTAAAAAAGTTGGAAATGGAATTTATCTTTTGGAAATTC AATT
TCTTAATCAATCAACAGTGTTCATTATTTGCCAAAAAAAAAAAAA 3`

cDNA Pool 7

Fragmentnummer= 339; Größe = 128bp

5`TTTTTTTTTTTGTAGTGAAAGAAAATTCAAATTTTTTGTAGTGCAAATATTTGAAATATTTGTTTTTGTGAAAGT
ACAAATATTTGCATTTTTTACTATAAATATCTACAGTTTGAAAAAAAAAAAAAAA 3`

Fragmentnummer= 341; Größe = 164pb

5`GATCCAGTACCTCAGCATCCTCTGAATAAAAAATTTCTCCTAACATTTATCTTAAATCTCCCTCTTTTAGT
TTAAATACATCCACTTGTCTATCATTATTAGACTGTGTAAGAGTTTCAGTCTAATAGTTGCTTATAAACTTTCC
TCAAGTACTGGATCA 3`

cDNA Pool 9

Fragmentnummer= 425; Größe = 135bp

5`GGAACCAATCAGTAGGAGAGAAGGAAATAGGAATTCTCCCTTCTCATAATAAAAAAATAAATGCAAACACTGT
ATAACGTGCACACATTA AAAAGATATCAACTGAAGGATTTAAGTCATTGCGATTGGTTCCA 3`

Fragmentnummer= 427; Größe = 139pb (cDNA Pool 9)

5`AAACTCCGTCGATAGTATTTGTTGATAAAATCAATCTTTCTCTTGTGATTAATCTATATGAAAGCTCAATT
ACATATAGAATTATTCAATTGTCATCTAAAAA AAAAAAAAAAACCCTGCTTAAAAAAAAAAAAA 3`

Fragmentnummer= 445; Größe = 361bp

5`GATCCAGTACATGGGAAGCAAGGCTGTGTGTTGTCTCTTTTTTGCAGCGCTATCAATCTGAGTCTCGTAAACA
CAGGAATTC AATGCCAACCGCTAGACTAACAGCGCCAACAGAGATTGCAACTATAGTGTCTTGGTCAAGTTCTA
GAGCTCTAATGCGTGGATACGACAGTTGAGAGCCCTGAACCTTCGAGAATTTGATCAATGGAGATAGTTTGACAC
GAGAAGAAGACGATAAGAAAGGAGAAGAAAGGCCAGGAAGAGAATGTGCCGTTGGTGATTATTGAAATCCAGGACT
TGGATGTTTTTATTGTTTTTATTTTATTGATTTGGAAGAAGAAGATTGATTTGGTACTGGATCA 3`

Fragmentnummer= 449,1; Größe = 116bp

5`GATCTCAGACATCTCAAGTCCAGAGGCTAAAGGAGATTTAAATACAGAAGAAGATGCAACATTATGGTTATCAC
TATTCCTAACTGAAGATGTATGTTACCTCGGTCTGAGATCA 3`

Fragmentnummer= 449,2; Größe = 190bp

5`GATCTCAGACCACAGTGGAAATAAAATTGTAATCAACTCCAAATGGAACTTCAAACCATGCAAATACATGG
AGCTTAAAAAATCTGCTCCTGAATGATCCTTGGGTCAAACGAAATCAAGATGGGAATAAAAAATATTC AAACA
TAATGACAATAGTGACACAACCTATCAAACGTCTGAGATCA 3`

cDNA Pool 11

Fragmentnummer= 551; Größe = 157bp

5`GATCACGTACACATTATCCTATCTTCCGGTAAAAAAGTAGGAGAAAAAGTTGCTAGTGGAGAAAGCAGATTTAGG
CGTATGTTTTGTTGGTACTGGCGTTGGTATTAGTAATGCAGCAAAACAAAGTCCCAGGTGTAAGAACAGCATTAGT
ACGTGATCA 3`

Fragmentnummer= 565; Größe = 237

GATCTGACTGTGAACTTATTAAGCACTCAAAAATCTTGAAGTTAAAATGTACTTGCCTAAAAATTTAGAACGT
CATATTTGGAATTGTTTCCTTTGTTTTGGAACACTTAAACTCAAATGATGTTAGTTACATTTTAGACAGACAGTTT
AATATAGCCACAAGAAGTGGTTATCACTGTGCGGCTTTGGTGCACAAATTTTAGGAACAATTGACTATTCAGGT
ACAGTCAGATCA 3`

Fragmentnummer= 567; Größe = 133bp

5`GATCATGGTCCACCCTCACATGCCTCACGATTTAATATATTATGAATTTCTTTGACTCTCAAATGTTGTAGGT
CAATGAATGTTTCCTAAAATTAGTTGAGGTTTGTGTAAGTTATGATATAAAAAAAAAAAAAA 3`

cDNA Pool 12

Fragmentnummer= 597; Größe = 136bp

5`GATCACGTACCATTTTTTTTTTACAAGCGGTTGGTTGATATTGATAATCCTAATACGATTATCATTACTCTG
ATGGATGCAATTAAGAGGAATCGCATTTCGATTTCGATTGGATTCCATGTGTATGTACGTGATCA 3`

Fragmentnummer= 619; Größe = 154bp

5`GATCATGGTCCAGGAATGAGTTAAGTATTAACCTGAGAGATTATGCAATTCAACCCCTTTAATTTTAGTGATGA
AGAAACAGACACTCAAAGAGAAAATTACTTGACCAAGATGCGGGTTGGGTGCCAGAATTCTGACCTCATGACCA
TGATCA 3`

Abb. 7.9: Darstellung der Sequenzierungsergebnisse der polymorphen cDNA Fragmente srteilt nach nach cDNA Pools 1 bis 12 (siehe Kapitel 4.3.1.1 Tab. 4.10) (Primersequenz grau hinterlegt).

Tab. 7.27 : Homologie zu bekannten Sequenzen der NCBI Datenbank.

Frag. Nr.	Größe	homologe Größe	Beschreibung der homologen Sequenz	Genbank-accession
17,1 ^x	155bp	24bp	<i>Lycopersicon esculentum</i> , 12 kb genomic	AF187790.1
201	106bp	26bp	<i>Antirrhinum majus</i> MYB-like transcription factor DIVARICATA (DIVARICATA) gene	AY077453.1
211	218bp	144bp	<i>Homo sapiens</i> BAC clone RP11-563E24 from 2	AC010105.12
341	164bp	73bp	<i>Gallus gallus</i> GART-B gene, exons 11-22, partial cds; and GART-A gene, exons 21 and 22 and partial	AF236855
425	135bp	129bp	<i>Homo sapiens</i> BAC clone RP11-1235O13 from 2	AC122940.3
445	361bp	185bp	Human DNA sequence from clone RP11-498M14 on chromosome 1	AL445675.9
551	157bp	144bp	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain SR1 clone step.1002g05 genomic	AF269372
567	296bp	20bp	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group), chromosome 10	NT_036288.1
619	154bp	149bp	Human DNA sequence from clone XXbac-97F8 on chromosome 6	AL929581.5

^x: Fragmentnummer als Beispiel für die homologe Fragmentgruppe b (mit den Nummern 17,2; 101; 217; 241; 477; 513,1 und 513,2).

Anhang 7.7.1 Isolierung von Genen der Ethylensignaltransduktion bei *Cucumis sativus* L.

Tab. 7.28: Homologievergleich und Amplifikation der homologen Sequenzbereich bei *C. sativus*.

Name ^y	annealing Temp.	Größe	Homologievergleich ^x		
			Genbank-akksession	Genname ^y	Pflanzenart
CTR1	51°C	220bp	AF387749 AY032953 L08789 AC07545 AY029067 AF305913 AF115019	CTR1 CTR1 CTR1 k. N. CTR2 EDR1 CTR	Cucumis melo <i>Rosa hybrid</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Rosa hybrid</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Lycopersicon esculentum</i>
EIN3	53°C	343bp	AF387795 AB063191 AB015855 AF328785 AF328784 AB063192 AF004217 AF247568	EIN3 <i>CmEIL1</i> k.N. <i>EIL2</i> <i>EIL1</i> <i>CmEIL2</i> <i>EIN3</i> <i>EIN3</i>	Cucumis melo <i>Cucumis melo</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Cucumis melo</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Nicotiana tabacum</i>
EIL1	47°C	371bp	AF004213 AB063191 AF261654 AJ298994 AF247568 AF443783	EIL1 <i>CmEIL1</i> <i>EIL1</i> <i>EIL1</i> <i>EIN3</i> <i>EIN3</i>	Arabidopsis thaliana <i>Cucumis melo</i> <i>Dianthus caryophyllus</i> <i>Fagus sylvatica</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Rosa hybrid</i>
EIL2	56°C	542bp	AB063192 AB063191 AB015855 AF004217 AF328786 AF328784 AB015855	CmEIL2 <i>CmEIL1</i> <i>EIN3</i> <i>EIN3</i> <i>EIL3</i> <i>EIL1</i> k. N.	Cucumis melo <i>Cucumis melo</i> <i>Cucumis melo</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>
ERF1	49°C	147bp	AB008103 AB008104 U89255 D38123 AF057373 AB035270	AtERF1 <i>AtERF2</i> <i>Pti4</i> <i>ERF1</i> <i>EREBP</i> <i>McEREBP</i>	Arabidopsis thaliana <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Matricaria chamomilla</i>
ERF3	40°- 65°C ^y	88bp	AB032201 AB024575 AB008106	ERF k. N. <i>AtERF4</i>	Arabidopsis thaliana <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>
ERF4	55°C	92bp	AB008106 AB003098 AB036884 U91857 D38124	AtERF4 <i>AP2</i> <i>AtERF8</i> k. N. <i>EREBP3</i>	Arabidopsis thaliana <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Stylanthus hamata</i> <i>Nicotiana tabacum</i>
ERF6	40°- 65°C ^y	84bp	AB008316 AF211527 AB016266 U81157 D38123	AtERF6 <i>Avr/Cf9</i> <i>nserf4</i> <i>S25-XP1</i> <i>ERF1</i>	Arabidopsis thaliana <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana sylvestris</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>
EBP	56°C	73bp	Y09942 AF003096 AJ299252 AF19077	EBP <i>AP2</i> <i>AP2</i> <i>EREBP</i>	Arabidopsis thaliana <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Oryza sativa</i>

^x: von der Sequenz des jeweils ersten Gens (fett) wurden die Primer abgeleitet

^y: Erklärung der Gen-Namen siehe Tab. 4.2 in Kapitel 4.2.4.

<i>CsCTR1</i>	-----TCCTCCAAACTTG	13
<i>CTR1</i>	CGCCTTCGCCACCCTAACATTGTTCTCTTCATGGGTGCGGTCACTCAACCTCCAAATTG	1980
	***** **	
<i>CsCTR1</i>	TCCATTGTAACAGAATACTTATCAAGGGGTAGTTTGACACAGGCTTTTGACACAGACCTGGG	73
<i>CTR1</i>	TCAATAGTGACAGAATATTTGTCAAGAGGTAGTTTATACAGACTTTTGATAAAAAGTGGA	2040
	** ** *	
<i>CsCTR1</i>	GCACGTGAAGTCTTAGATGAGAGACGACGGTTAAACATGGCATATGATGTTGCAAAGGGA	133
<i>CTR1</i>	GCAAGGGAGCAATTAGATGAGAGACGTGCGCTGAGTATGGCTTATGATGTGGCTAAGGGA	2100
	** *	
<i>CsCTR1</i>	ATGAATTATCTTCACAAACGTAATCCCCAATTGTTTCATCGCGATTGAAATCACCAAAT	193
<i>CTR1</i>	ATGAATTATCTTCACAATCGCAATCCTCCAATTGTGCATAGAGATCTAAAATCTCCAAAC	2160
	***** ** *	
<i>CsCTR1</i>	CTTTTGGTTGATAAGAAGTACAC-----	216
<i>CTR1</i>	TTATTGGTTGACAAAAATATACAGTCAAGGTTTGTGATTTTGGTCTCTCGGATTGAAG	2220
	* ***** ** * * * * *	

Abb. 7.10: Homologievergleich der Nukleinsäuresequenz zwischen *CTR1* aus *Arabidopsis* und *CsCTR1* aus *C. sativus* Primerbindungssequenz grau hinterlegt.

<i>CTR1</i>	KRLRHPNIVLFMGAVTQPPNLSIVTEYLSRGSlyRLLHKSGAREQLDERRRLSMAYDVAK	660
<i>CsCTR1</i>	-----PPNLSIVTEYLSRGSlyRLLHRPGAREVLDERRRLNMAYDVAK	43
	*****:****:.* ** * * * * * .*****	
<i>CTR1</i>	GMNYLHNRNPPIVHRDLKSPNLLVDKKYTVKVCDFGLSRLKASTFLSSKSAAGTPEWMAK	720
<i>CsCTR1</i>	GMNYLHKRNPPIVHRDLKSPNLLVDKKYT-----	72
	*****:*****	

Abb. 7.11: Homologievergleich der Aminosäuresequenz zwischen *CTR1* aus *Arabidopsis* und *CsCTR1* aus *C. sativus*; * = identische Aminosäure, : = zwei Nukleotide des für die Aminosäuren kodierenden Triplets sind identisch, . = ein Nukleotid des für die Aminosäuren kodierenden Triplets ist identisch.

<i>CsEIN3</i>	-----AGGAGGAAGAAGATGTCCAGGGCACATGATGGGATCTTGAA	41
<i>EIN3</i>	GCAGTCTCAAGAGCAAGCTAGGAGGAAGAAAATGTCTAGAGCTCAAGATGGGATCTTGAA	480
	***** *	
<i>CsEIN3</i>	ATATATGTTGAAGATTATGGAAGTCTGTAATGCTCAAGGTTTTGTATACGGAATAATTCC	101
<i>EIN3</i>	GTATATGTTGAAGATGATGGAAGTTTGTAAAGCTCAAGGCTTTGTTTATGGGATTTATCC	540
	***** *	
<i>AtEIN3</i>	TGAGAAGGGAAAACCGTAACCGGGGCATCGGATAATCTGCGAGAGTGGTGGAAAGACAA	161
<i>EIN3</i>	GGAGAATGGGAAGCCTGTGACTGGTGCTTCTGATAATTTAAGGGAGTGGTGGAAAGATAA	600
	***** *	
<i>CsEIN3</i>	AGTCAGATTTGATAGAAACGGACCAGCTGCCATAGCCAAGTACCAGGCAGACAATGCAAT	221
<i>EIN3</i>	GGTTAGGTTTTGATCGTAATGGTCTGCGCTATTACCAAGTATCAAGCGGAGAATAATAT	660
	** ** *	
<i>CsEIN3</i>	TCCTGGACGAAATGATGGCTGTAATTCAATCGGTCCAACCCCTCACACCTTGCAAGAACT	281
<i>EIN3</i>	CCCGGGGATTCATGAAGGTAATAACCCGATTGGACCGACTCCTCATACCTTGCAAGAGCT	720
	** ** *	
<i>CsEIN3</i>	TCAGGATACCACCTTAGGTTCTCTTTTATCAGCTCTGATGCAGCACTGTGACCCTCCTCA	341
<i>EIN3</i>	TCAAGACACGACTCTTGATCGCTTTTGTCTGCGTTGATGCAACACTGTGATCCTCCTCA	780
	** *	
<i>CsEIN3</i>	AAA-----	344
<i>EIN3</i>	GAGACGTTTTCTTTGGAGAAAGGAGTTCCTCCTCCGTGGTGGCCTAATGGGAAAGAGGA	840
	*	

Abb. 7.12: Homologievergleich der Nukleinsäuresequenz zwischen *EIN3* aus *Arabidopsis* und *CsEIN3* aus *C. sativus* Primerbindungssequenz grau hinterlegt.

```

CsEIN3 -----RRKKMSRAHDGILKYMLKIMEVCNAQGFVYGI I 33
EIN3  RLKRLKEQDKGKEGVDAAKQRQSQEQAARRKKMSRAQDGIILKYMLKMMEVCKAQGFVYGI I 120
          *****:*****:****:*****

CsEIN3 PEKGPVVTGASDNLREWWDKVRFRDRNGPAAIAKYQADNAIPGRNDGCNSIGTPHTLQE 93
EIN3  PENGKPVVTGASDNLREWWDKVRFRDRNGPAAITKYQAENNIPIGHEGNNPIGTPHTLQE 180
          *:*****:*****:*  ***  ::*  * . *****

CsEIN3 LQDTTLGSLLSALMQHCDPPQ----- 114
EIN3  LQDTTLGSLLSALMQHCDPPQRRFPLEKGVPPPWWPNKEDWWPQLGLPKDQGPAPYKKP 240
          *****

```

Abb. 7.13: Homologievergleich der Aminosäuresequenz zwischen *EIN3* aus *Arabidopsis* und *CsEIN3* aus *C. sativus*

* = identische Aminosäure, : = zwei Nukleotide des für die Aminosäuren kodierenden Triplets sind identisch, . = ein Nukleotid des für die Aminosäuren kodierenden Triplets ist identisch.

```

EIL1  ATTCTGAGAAGGGTAAGCCTGTGACTGGTGCTTCGGATAATTTGAGGGAATGTTGGAAA 420
CsEIL1 -----TGATAATTTGAGGGAATGTTGGAAA 25
          *****

EIL1  GATAAGGTTAGGTTTGATCGTAATGGTCCAGCTGCTATTGCTAAGTATCAGTCAGAGAAT 480
CsEIL1 GATAAGGTTAGGTTTGATCGTAATGGTCCAGCTGCTATTGCTAAGTATCAGTCAGAGAAT 85
          *****

EIL1  AATATTTCTGGAGGGAGTAATGATTGTAACAGCTTGGTTGGTCCAACACCGCATACGCTT 540
CsEIL1 AATATTTCTGGAGGGAGTAATGATTGTAACAGCTTGGTTGGTCCAACACCGCATACGCTT 145
          *****

EIL1  CAGGAGCTTCAGGACACGACTCTTGGTTCGCTTTTATCGGCTTTGATGCAACATTTGATGAT 600
CsEIL1 CAGGAGCTTCAGGACACGACTCTTGGTTCGCTTTTATCGGCTTTGATGCAACATTTGATGAT 205
          *****

EIL1  CCACCGCAGAGACGGTTTCTTTGGAGAAAGGAGTTTCTCCACCTTGGTGGCCTAATGGG 660
CsEIL1 CCACCGCAGAGACGGTTTCTTTGGAGAAAGGAGTTTCTCCACCTTGGTGGCCTAATGGG 265
          *****

EIL1  AATGAAGAGTGGTGGCCTCAGCTTGGTTTACCAAATGAGCAAGGTCCTCCTCCTTATAAG 720
CsEIL1 AATGAAGAGTGGTGGCCTCAGCTTGGTTTACCAAATGAGCAAGGTCCTCCTCCTTATAAG 325
          *****

EIL1  AAGCCTCATGATTTGAAGAAAGCTTGGAAAGTCGGTGTTTTAACTGCGGTGATCAAGCAT 780
CsEIL1 AAGCCTCATGATTTGAAGAAAGCTTGGAAAGTCGGTGTTTTAACTGC----- 372
          *****

```

Abb. 7.14: Homologievergleich der Nukleinsäuresequenz zwischen *EIL1* aus *Arabidopsis* und *CsEIL1* aus *C. sativus* Primerbindungssequenz grau hinterlegt.

```

CsEIL1 -----DNLREWWDKVRFRDRNGPAAIAKYQSENNISGGSNDCNSLVGTPHTL 48
EIL1  IPEKGPVVTGASDNLREWWDKVRFRDRNGPAAIAKYQSENNISGGSNDCNSLVGTPHTL 180
          *****

CsEIL1 QELQDTTLGSLLSALMQHCDPPQRRFPLEKGVSPWPWPNGNEEWWPQLGLPNEQGPPPYK 108
EIL1  QELQDTTLGSLLSALMQHCDPPQRRFPLEKGVSPWPWPNGNEEWWPQLGLPNEQGPPPYK 240
          *****

CsEIL1 KPHDLKKAWKVGVL----- 123
EIL1  KPHDLKKAWKVGVLTAVIKHMSPDIAKIRKLVRSKCLQDKMTAKESATWLAIINQEEVV 300
          *****

```

Abb. 7.15: Homologievergleich der Aminosäuresequenz zwischen *EIL2* aus *Arabidopsis* und *CsEIL2* aus *C. sativus*

* = identische Aminosäure, : = zwei Nukleotide des für die Aminosäuren kodierenden Triplets sind identisch, . = ein Nukleotid des für die Aminosäuren kodierenden Triplets ist identisch.

<i>CsEIL2</i>	-----CGGGCTC	7
<i>EIL2</i>	TGAAGCAGCAACATGATGATTTTTCCAGAGCACTCTAGTAAGAGAACCATGTACAAGGCAC	300
	*** *	
<i>CsEIL2</i>	AAGATGGGATCCTGAAGTATATGTTGAAAATGATGGAGGTCTGCAAAGCTCAAGGGTTTCG	67
<i>EIL2</i>	AAGATGGGATCTTGAAGTACATGTGGAAGACAATGGAGCGATATAAAGCTCAAGGTTTTTG	360
	***** *	
<i>CsEIL2</i>	TTTATGGGATTATTCTCTGAGAAAAGGAAAACCAGTCAGTGGAGCTTCTGATAATCTTCGTG	127
<i>EIL2</i>	TTTATGGGATTGTGTTAGAGAATGGGAAAACGGTAGCGGGATCTTCTGATAATCTCCGTG	420
	***** *	
<i>CsEIL2</i>	CATGGTGGAAAGAGAAGGCTAGATTTCGATAGAAAATGGCCCTGCAGCAATTGCCAAATATC	187
<i>EIL2</i>	AATGGTGGAAAGACAAAGTGAGTTTTGATAGGAACGGCCAGCTGTATAATCAAGCACC	480
	***** *	
<i>CsEIL2</i>	AGGCAGACCACGCAATTCCTGGAAACAACAAT---GACTGCAATTCAGTGGCATCCACTC	244
<i>EIL2</i>	AAAGGGATATCAATCTTTCTGATGGAAGTGATTTCAGGGTCTGAGGTTGGGGATTCTACCG	540
	* *	
<i>CsEIL2</i>	CTCACACCTTACAAGAGCTTCAAGACACAACCCTTGGATCACTTTTGTGACGCTCTGATGC	304
<i>EIL2</i>	CACAGAAGTTGCTTGAGCTTCAAGATACTACTCTTGGAGCTCTGTTATCGGCTCTGTTTC	600
	* *	
<i>CsEIL2</i>	AGCACTGTGATCCACCTCAGAGGCGTTTTCCATTGGAGGAGGGAGTTTCCCCGCCATGGT	364
<i>EIL2</i>	CTCACTGCAACCCTCCTCAGAGGCGGTTTTCCGTTGGAGAAAGCGTGACACCGCCATGGT	660
	***** *	
<i>CsEIL2</i>	GGCCAACCGGAGATGAGGAATGGTGGCCTGAACTAGGACTACCTAAGGAC---CAGGGT-	420
<i>EIL2</i>	GGCCAACGGGGAAAGAAGATTGGTGGGATCAACTGTCTTTACCCGTTGATTTTCGAGGTG	720
	***** *	
<i>CsEIL2</i>	--CTACCTCCTTACAAGAAGCCCCATGATTTGAAGAAGGCTTGGAAAAGTCAGTGTCTCA	478
<i>EIL2</i>	TTCCGCCACCTTACAAGAAGCCTCATGATCTCAAGAAGCTGTGGAAAATTTGGTGTTTTGA	780
	* *	
<i>CsEIL2</i>	CTGCTGTGATTAAGCATATGTACCTGATATTGCCAAGATTTCGCAAGCTTGTTCGCCAGT	538
<i>EIL2</i>	TTGGTGTAAATCAGACATATGGCTTCTGACATTAGCAACATAACCAATCTCGTGAGACGGT	840
	* *	
<i>CsEIL2</i>	CCAA-----	542
<i>EIL2</i>	CTAGAAGTTTGCAGGAGAAAATGACGTCAAGAGAAGGCGCTTTATGGCTCGCTGCTCTTT	900
	* *	

Abb. 7.16: Homologievergleich der Nukleinsäuresequenz zwischen *AtEIL2* aus *Arabidopsis* und *CsEIL2* aus *C. sativus* Primerbindungssequenz grau hinterlegt.

<i>CsEIL2</i>	-----RAQDGILKYMLKMMEVCKAQGFVYG	25
<i>EIL2</i>	LKRLKEMAKNGLGTRLLLLKQHQHDDFPEHSSKRTMYKAQDGILKYMSKTMERYKAQGFVYG	120
	:***** * * * * *	
<i>CsEIL2</i>	I IPEKGKPVSGASDNLRAWWKEKARFDRNGPAAIAKYQADHAIP-GNNNDNSVASTPHT	84
<i>EIL2</i>	IVLENGKTAVGSSDNLREWWKDKVRFDRNGPAAI IKHQ RDINLSDGSDSGSEVGDSTAQK	180
	*: *:	
<i>CsEIL2</i>	LQELQDNTLLGSLLSALMQHCDPPQRRFPLEEGVSPWPWPTGDEEWWPELGLPKD-QGLPP	143
<i>EIL2</i>	LLELQDNTLLGALLSALFPHCNPPQRRFPLEKGVTPPWPTGKEDWWDQLSLPVDVFRGVPP	240
	* *****:	
<i>CsEIL2</i>	-YKKPHDLKKAWKVSVLTAVIKHMSPIAKIRKLVRQS-----	180
<i>EIL2</i>	PYKKPHDLKKLWKIGVLI GVIRHMASDISNIPNLVRRSRSLQEKMTSREGALWLAALYRE	300
	***** *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:	

Abb. 7.17: Homologievergleich der Aminosäuresequenz zwischen *EIL2* aus *Arabidopsis* und *CsEIL2* aus *C. sativus*.

* = identische Aminosäure, : = zwei Nukleotide des für die Aminosäuren kodierenden Triplets sind identisch, . = ein Nukleotid des für die Aminosäuren kodierenden Triplets ist identisch.

```

AtERF1   GCGAAGGGAAAGCATTATAGAGGAGTGAGACAAAGCCGTGGGGGAAATTTGCGGCGGAG 480
CsERF1   -----GGGAAAGCATTATAGAGGAGTGAGGCTCAGACCGTGGGGAAAATGGGCTGCTGAG 55
          *****
AtERF1   ATTAGAGACCCGGCGAAGAACGGAGCTAGGGTTTGGTTAGGAACGTTTGGAGACGGCGGAG 540
CsERF1   ATTCGTGATC---CAAAAAAGGCAGCAAGAGTGTGGTTGGGCACCTTTGACACTGCCGAG 112
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AtERF1   GACGCGGCGTTGGCTTACGACAGAGCTGCTTTTCAGGATGCGTGGTTCCCGCGCTTTGTTG 600
CsERF1   GCTGCGGCACTTGCTTACGACAGAGCTGCTTT----- 144
          ** ***** * *****

```

Abb. 7.18: Homologievergleich der Nukleinsäuresequenz zwischen *AtERF1* aus *Arabidopsis* und *CsERF1* aus *C. sativus* Primerbindungssequenz grau hinterlegt.

```

CsERF1   -----GKHYRGVRLRPWGKWAAEIRDPKK-AARVWLGTDFDTE 37
AtERF1   VDSVPVKKEKTSVPSAAVTAAGKHYRGVRRPQWGFKFAAEIRDPKNGARVWLGTDFETAE 180
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsERF1   AAALAYDRAAL----- 48
AtERF1   DAALAYDRAAFRMRGSRALLNFPLRVNSGEPDPVRIKSKRSSFSNENGGAPKKRRTVAA 240
          ***** :

```

Abb. 7.19: Homologievergleich der Aminosäuresequenz zwischen *AtERF1* aus *Arabidopsis* und *CsERF1* aus *C. sativus*.

* = identische Aminosäure, : = zwei Nukleotide des für die Aminosäuren kodierenden Triplets sind identisch, . = ein Nukleotid des für die Aminosäuren kodierenden Triplets ist identisch.

```

CsETF2   ATGCGGCGAGGCAGACCCCTCAGATCCATTTACAGCTACAGAAATACCCAATT-CAACCAT 59
AtETF4   -----ATGGCCAAGATGGGCTTGAAACCCGACCCGGCTACTACTAA 41
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsETF2   TCAGCCGGAAAATCCTCTCAAAGAGATTGTTACAGAGGCGTTTCGTAAGCGTCCTTGGGG 119
AtETF4   CCAGACCCACAATAATGCCAAGGAGATTGTTACAGAGGCGTTAGGAAGCGTCCTTGGGG 101
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsETF2   TAGATACGCTGCGGAGCTGCTGAGATCAGAGATCCTTGGAAAGAAAAGTCTGGCTT 179
AtETF4   CCGTTATGCCGC-----CGAGATCCGAGATCCGGGCAAGAAAACCCGCTCTGGCTT 153
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsETF2   GGCACCTTTC AACACCCGCGGAGGAAGCGGCCAGAGCATACGATGAAGCTGCCAAGCGGATC 239
AtETF4   GGCACCTTTCGATACGGCTGAAGAGGCGGCGCTGCTTACGATACGGCGGCGCTGATTTT 213
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsETF2   CGAGGAGAAAAGGCGAAGCTCAACTTTGC-----TCCAGCGCCCGTCGCTCGCGGCT 293
AtETF4   CGTGGTGCTAAGGCTAAGACCAATTTCCCAACTTTTCTCGAGCTGA-GTGACCAGAAGGT 272
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsETF2   CAGCGTCAAACCTCCGGTAAAA---ATGCAAGTGCCTCGTCCCCGAGTTTACTCCGAGTGG 349
AtETF4   CCCTACCGGTTTTGCGCGTAGCCCTAGCCAGAGCAGCAGCTCGACTGTGCTTCTC---- 328
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsETF2   CTTGAACACCACCGGTTTCGCTCCGTGTACACGTGCGGATAGTTTCGTGTGACAGCGAGGA 409
AtETF4   CTCCGACGTTAGTTGT--GCCTTACGCGACGGCTGGGAAT-GTTCCCCG-CAGCTCGAG 384
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsETF2   GTTGTACTACGGCGAGGAGTTGGCGAGTTTGGAGATCGTTCTTGGGTCTGGATAGCGAGGA 469
AtETF4   CTTAGTCTCGGCGGAGGAGGCGGCG-GCTCG---TGTTATCAGATCCCGATGTGCGGTC 439
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsETF2   GCAACAAGCGAGTGAACCTCGGTGAAATGGGGAGTTTCGAACGAGTTGATTTGGATGTTTG 529
AtETF4   CTGTCTACTTTTTGGACCTGATGGGGATCGGTAA--CGTAGGTCGTGGTCAGCCTCCTCC 497
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CsETF2   GATGATGGACGACATGTCGTTGAATGAGCAGAAGTTCAGTCAGATGGTACGAACGTAACG 589
AtETF4   TGTGACAT-CGGCGT---TTAGATCGCCGGTGGTGCAT---GTTGCGACGAAGATGGCT 549
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```



```

CsETF2 TAAAGTGTTCGTTTCGACAT--GTTGGTTATTGGTGTGTGTAATATTTTAAAAATGGTTTT 647
AtETF4 TGTGGTGCCCAAAGCGACTCTGATTTCGTATCGGT---CGTTGATTTTCGAAGGTGGGATG 606
*   *** *   ****   ** ** *   **   **   ** *   **   *
CsETF2 TCTGTCTGAGCTTTGAAGTGTTTTGGCGTAGCCCTTTGTAGATATTATT-ATGGAGATTG 706
AtETF4 G--AGAAGAGATCTCAGCTGTTA-GATCTAGATCTTAATTTGCTCCTCCATCGGAACAG 663
      *** * * *   **** *   *** ** *   *   * *   * *   *
CsETF2 AATAAA 712
AtETF4 GCCTGA 669
      *

```

Abb. 7.20: Homologievergleich der Nukleinsäuresequenz zwischen *AtETR4* aus *Arabidopsis* und *CsETR2* aus *C. sativus* Primerbindungssequenz (*CsERF2*) grau hinterlegt, *CsERF2.1* dunkelgrau hinterlegt und *CsERF2.1* dunkelgrau hinterlegt und unterstrichen.

Homologievergleich der Aminosäuresequenz zwischen *AtERF4* aus *Arabidopsis* und *CsERF2* aus *C. sativus* (siehe Kapitel Abb. 4.15).

```

CsEREBP GGAGGAATTATATTAGAGAGAAAAATGTGCGGTGGTGCCATTATCTCTGATT----- 52
AtEREBP -----ATGTGTGGCGGTGCTATTATTTCCGATTATGCCCT 36
      ***** ** ***** ***** ** *****
CsEREBP -TTATAGAGAAAAAGCGAACTTGTAAAGCTTAAACAATGAATCTCTTTGGTCCCATATCGAC 111
AtEREBP CTCGTCACCAAGGCCAAGGGCCGTAAACTCACGGCTGAGGAACTCTGGTCAGAGCTCGAT 96
      * *   **   **** ** *   ***   ** ***** *   ****
CsEREBP CCTTTCTCCG-----ATCTCCTCGGCCTCAATTATTCCTCTGTGAAA-----ACTGAG 159
AtEREBP GCTTCCGCCGCCGACGACTTCTGGGGTTTCTATTCCACCTCCAACTCCATCCCACCAAC 156
      *** * ***   * **   ** ** *   ****   ** *
CsEREBP ACGCCTAAGAAAAGAAAACCGATCTACGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGAGAAGACTCGA 219
AtEREBP CAAGTTAACGTGAAAGAGGAGGCAGTGAAGAAGGAGCAGGCAACAGAGCCGGGAAACGG 216
      ***   * * *   *   * *   ***** **   * * * *   * *   **
CsEREBP AAAGCTCGGAAGAATATATACAGAGGAATCCGGCAACGGCCGTGGGGAAAAATGGGCGGCG 279
AtEREBP AGGAAGAGGAAGAATGTTTATAGAGGGATACGTAAGCGTCCATGGGGAAAAATGGGCGGCT 276
      *   ***** * ** ***** ** ** * ** ** *****
CsEREBP GAGATTCGGGACCCACGAAAAGGAGTTTCGAGTTTGGCTCGGCACCTTTCAACACCGCGGAG 339
AtEREBP GAGATTCGAGATCCACGAAAAGGTGTTAGAGTTTGGCTTGGTACGTTCAACACGGCGGAG 336
      ***** ** ***** ***** ** ***** ** ** *****
CsEREBP GAAGCTGCCATGG----- 352
AtEREBP GAAGCTGCCATGGCTTATGATGTTGCGGCCAAGCAGATCCGTGGTGATAAAGCCAAGCTC 396
      *****

```

Abb. 7.21: Homologievergleich der Nukleinsäuresequenz zwischen *EREBP* aus *Arabidopsis* und *CsEREBP* aus *C. sativus*; Primerbindungssequenz grau hinterlegt.

```

EREBP MCGGAIISDYAPLVTKAKGRKLTAEELWSELDAASAADDFWGFYSTSKLHPTNQVNVKEEA 60
CsEREBP MCGGAIISD--FIEKKRTCKLNNESSLWSHIDP--FSDLGLNYSSVKTETPKK--RNRS 53
      ***** : : * : ** . * .*** .: . . : * : : * : : :
EREBP VKKEQATEPGKRRKRKNVYRGIRKRPWGKWAAEIRDPRKGVRVWLGTFNTAEAAAMAYDV 120
CsEREBP TAAEAVAVEKTRKARKNIYRGIRQRPWGKWAAEIRDPRKGVRVWLGTFNTAEAAAM---- 109
      . * . : . : * : *** : ***** : *****

```

Abb. 7.22: Homologievergleich der Aminosäuresequenz zwischen *EREBP* aus *Arabidopsis* und *CsEREBP* aus *C. sativus*.

* = identische Aminosäure, : = zwei Nukleotide des für die Aminosäuren kodierenden Triplets sind identisch, . = ein Nukleotid des für die Aminosäuren kodierenden Triplets ist identisch.


```

CsEIL1  GGTTTCGCTTTTATCGGCTTTGATGCAACATTGTGATCCACCGCAGAGACGCTTTTCCTTTG  229
CsEIL2  GGATCACTTTTGTGAGCTCTGATGCAGCACTGTGATCCACCTCAGAGGCGTTTTCCATTG  339
CsEIN3  GGTTCTCTTTTATCAGCTCTGATGCAGCACTGTGACCCTCCTCAAAA-----  344
          ** ** ***** ** *** ***** ** ***** ** ** *
CsEIL1  GAGAAAGGAGTTTCTCCACCTTGGTGGCCTAATGGGAATGAAGAGTGGTGGCCTCAGCTT  289
CsEIL2  GAGGAGGGAGTTTCCCGCCATGGTGGCCAACCGGAGATGAGGAATGGTGGCCTGAACTA  399
CsEIN3  -----
CsEIL1  GGTTTACCAAATGAGCAAGGTCCTCCTCCTTATAAGAAGCCTCATGATTTGAAGAAAGCT  349
CsEIL2  GGACTACCTAAGGACCAGGTCTACCTCCTTACAAGAAGCCCCATGATTTGAAGAAGGCT  459
CsEIN3  -----
CsEIL1  TGGAAAGTCGGTGTTTTAACTGC-----  372
CsEIL2  TGGAAAGTCAGTGTTCCTCACTGCTGTGATTAAGCATATGTCACCTGATATTGCCAAGATT  519
CsEIN3  -----
CsEIL1  -----
CsEIL2  CGCAAGCTTGTTTCGCCAGTCCA  541
CsEIN3  -----

```

Abb. 7.25: Homologievergleich der konservativen Nukleinsäuresequenz zwischen *CsEIL*, *CsEIL2* und *CsEIN3* aus *C. sativus*.

```

CsEIL1  -----DNLREWWKDKVRFDRN  16
CsEIL2  -----RAQDGILKYMLKMMEVCKAQGFVYGI IPEKGKPVSGASDNLRAWWKEKARFDRN  54
CsEIN3  RRKKMSRAHDGILKYMLKIMEVCNAQGFVYGI IPEKGKPVTVGASDNLREWWKDKVRFDRN  60
          **** *:* . *****
CsEIL1  GPAAIAKYQSENNISGGSNDCNSLVGPTPHTLQELQDRTLGSLLSALMQHCDPPQRRFPL  76
CsEIL2  GPAAIAKYQADHAIPGNNDNCNS-VASTPHTLQELQDRTLGSLLSALMQHCDPPQRRFPL  113
CsEIN3  GPAAIAKYQADNAIPGRNDGCNS-IGTPHTLQELQDRTLGSLLSALMQHCDPPQ-----  114
          *****::: *.* .:.*** :..*****
CsEIL1  EKGVSPPWWPNGNEEWWPQLGLPNEQGPPPYKKPHDLKKAWKVGVL-----  123
CsEIL2  EEGVSPPWWPTGDEEWWPELGLPKDQGLPPYKKPHDLKKAWKVSVLTAVIKHMSPIAKI  173
CsEIN3  -----
CsEIL1  -----
CsEIL2  RKLVRQS  180
CsEIN3  -----

```

Abb. 7.26: Homologievergleich der konservativen Aminosäuresequenz zwischen *CsEIL1*, *CsEIL2* und *CsEIN3* aus *C. sativus*.

* = identische Aminosäure, : = zwei Nukleotide des für die Aminosäuren kodierenden Triplets sind identisch, . = ein Nukleotid des für die Aminosäuren kodierenden Triplets ist identisch.

Anhang 7.8 Homologievergleich der Ethylenperzeption und Ethylensignaltransduktion zwischen gynösischen und hermaphroditischen Linien

Es sind nur Sequenzen dargestellt, die Unterschiede zwischen den gynösischen und hermaphroditischen Linien (aus dem genetischen Hintergrund WrD) zeigen.

<i>CsEIL1h</i>	TGATAATTTGAGGGAATGGTGGAAAGATAAAGGTTAGGTTTGATCGTAATGGTCCAGCTGC	60
<i>CsEIL1g</i>	TGATAATTTGAGGGAATGGTGGAAAGATAAAGGTTAGGTTTGATCGTAATGGTCCAGCTGC	60

<i>CsEIL1h</i>	TATTGCTAAGTATCAGTCAGAGAATAATATTTCTGGAGGGAGTAATGATTGTAACAGCTT	120
<i>CsEIL1g</i>	TATTGCTAAGTATCAGTCAGAGAATAATATTTCTGGAGGGAGTAATGATTGTAACAGCTT	120

<i>CsEIL1h</i>	GGTTGGTCCAACACCGCATACGCTTCAGGAGCTTCAGGACACGACTCTTGGTTCGCTTTT	180
<i>CsEIL1g</i>	GGTTGGTCCAACACCGCATACGCTTCAGGAGCTTCAGGACACGACTCTTGGTTCGCTTTT	180

<i>CsEIL1h</i>	ATCGGCTTTGATGCAACATTGTGATCCACCGCAGAGACGGTTTCCTTTGGAGAAAGGAGT	240
<i>CsEIL1g</i>	ATCGGCTTTGATGCAACATTGTGATCCACCGCAGAGACGGTTTCCTTTGGAGAAAGGAGT	240

<i>CsEIL1h</i>	TTCTCCACCTTGGTGGCCTAATGGGAATGAAGAGTGGTGGCCTCAGCTTGGTTTACCAA	300
<i>CsEIL1g</i>	TTCTCCACCTTGGTGGCCTAATGGGAATGAAGAGTGGTGGCCTCAGCTTGGTTTACCAA	300

<i>CsEIL1h</i>	TGAGCAAGGTCTCCTCCTTATAAGAAGCCTCATGACTTGAAGAAAGCTTGGAAAGTCGG	360
<i>CsEIL1g</i>	TGAGCAAGGTCTCCTCCTTATAAGAAGCCTCATGACTTGAAGAAAGCTTGGAAAGTCGG	360

<i>CsEIL1h</i>	TGTTTTAACTGC	372
<i>CsEIL1g</i>	TGTTTTAACTGC	372

Abb. 7.27: Homologievergleich der Aminosäuresequenz zwischen *CsEIL2* aus gynösischen und hermaphroditischen Linien, Primerbindungssequenzen hell grau, Signle Nukleotid Polymorphismen.

<i>CsEILh</i>	-CGGGCTCAAGATGGGATCCTGAAGTATATGTTGAAAATGATGGAGGTCTGCAAAGCTCA	59
<i>CsEILg</i>	TCGGGCTCAAGATGGGATCCTGAAGTATATGTTGAAAATGATGGAGGTCTGCAAAGCTCA	60

<i>CsEILh</i>	AGGGTTCGTTTATGGGATTATTCCTGAGAAAAGGAAAACCAGTCAGTGGAGCTTCTGATAA	119
<i>CsEILg</i>	AGGGTTCGTTTATGGGATTATTCCTGAGAAAAGGAAAACCAGTCAGTGGAGCTTCTGATAA	120

<i>CsEILh</i>	TCTTCGTGCATGGTGGAAAGAGAAGGTTAGATTTCGATAGAAATGGCCCTGCAGCAATTGC	179
<i>CsEILg</i>	TCTTCGTGCATGGTGGAAAGAGAAGGTTAGATTTCGATAGAAATGGCCCTGCAGCAATTGC	180

<i>CsEILh</i>	CAAATATCAGGCAGACCACGCAATTCCTGGAAACAACAATGACTGCAATTCAGTGGCATC	239
<i>CsEILg</i>	CAAATATCAGGCAGACCACGCAATTCCTGGAAACAACAATGACTGCAATTCAGTGGCATC	240

<i>CsEILh</i>	CACTCCTCACACCTTACAAGAGCTTCAAGACACAACCCTTGGATCACTTTTGTGTCAGCTCT	299
<i>CsEILg</i>	CACTCCTCACACCTTACAAGAGCTTCAAGACACAACCCTTGGATCACTTTTGTGTCAGCTCT	300

Fortsetzung der Abbildung nächste Seite.

```

CsEILh  GATGCAGCACTGTGATCCACCTCAGAGGCGTTTTCCATTGGAGAAGGGAGTTTCCCCGCC 359
CsEILg  GATGCAGCACTGTGATCCACCTCAGAGGCGTTTTCCATTGGAGAAGGGAGTTTCCCCGCC 360
*****

CsEILh  ATGGTGGCCAACCGGAGATGAGGAATGGTGGCCTGAACTAGGACTACCTAAGGACCAGGG 419
CsEILg  ATGGTGGCCAACCGGAGATGAGGAATGGTGGCCTGAACTAGGACTACCTAAGGACCAGGG 420
*****

CsEILh  TCTACCTCCTTACAAGAAGCCCCATGATTTGAAGAAGGCTTGGAAAGTCAGTGTTCAC 479
CsEILg  TCTACCTCCTTACAAGAAGCCCCATGATTTGAAGAAGGCTTGGAAAGTCAGTGTTCAC 480
*****

CsEILh  TGCTGTGATTAAGCATATGTCACCTGATATTGCCAAGATTGCGCAAGCTTGTTCGCCAGTC 539
CsEILg  TGCTGTGATTAAGCATATGTCACCTGATATTGCCAAGATTGCGCAAGCTTGTTCGCCAGTC 540
*****

CsEILh  CA- 541
CsEILg  CAA 543
**

```

Abb. 7.28: Homologievergleich der Aminosäuresequenz zwischen *CsEIL1* aus gynözischen und hermaphroditischen Linien, Primerbindungssequenzen hell grau, Single Nukleotid Polymorphismen.

8 Danksagung

Mit der Vorlage der Dissertation verbinde ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. Tatlioglu für die Überlassung des Themas und für seine stetige Unterstützung im Verlauf der Arbeit, bei gleichzeitiger Gewährung eines sehr großen Freiraums bei der Ausgestaltung des Themas.

Herrn Prof. Dr. Maiß möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der Abteilung Angewandte Genetik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen gilt dieser Dank Herrn Dr. Thomas Engelke für seine vielseitige Unterstützung, stete Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Besonderer Dank gilt auch Frau Ingrid Robotta, die durch ihre zuverlässige und vielseitige Unterstützung bei den Laborarbeiten eine große Hilfe war.

Weiterhin möchte ich Frau MSc. Ilknur Vural und Herrn Dipl.- Ing. agr. Michael Schmolke für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei einem Teil der praktischen Arbeiten danken.

Meiner Familie danke ich für die vielseitige Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion. Besonders meiner Mutter die mit großer Sorgfalt das Manuskript korrigiert hat.

Nicht zuletzt gilt mein großer Dank meiner Freundin Jessica Schoppe, die mir durch Ihre persönliche Unterstützung eine große Hilfe war.

9 Lebenslauf

<u>Name:</u>	Heiko Mibus geboren am 25.03.1972
<u>Schulbildung:</u> 1978 - 1991	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, an der Leibnizschule Hannover
<u>Studium:</u> 1991 - 1997	Gartenbau, Universität Hannover Abschluss: Diplom Ingenieur Agrarwissenschaften
<u>Promotionsstudium:</u> 1998 - 2002	Abteilung Angewandte Genetik, Institut für Zierpflanzenbau, Baumschule und Pflanzenzüchtung, Universität Hannover
<u>Berufstätigkeit:</u> 1998 - 2002 seit 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Angewandte Genetik, Universität Hannover Wissenschaftlicher Hochschulassistent in der Abteilung Zierpflanzenbau; Universität Hannover